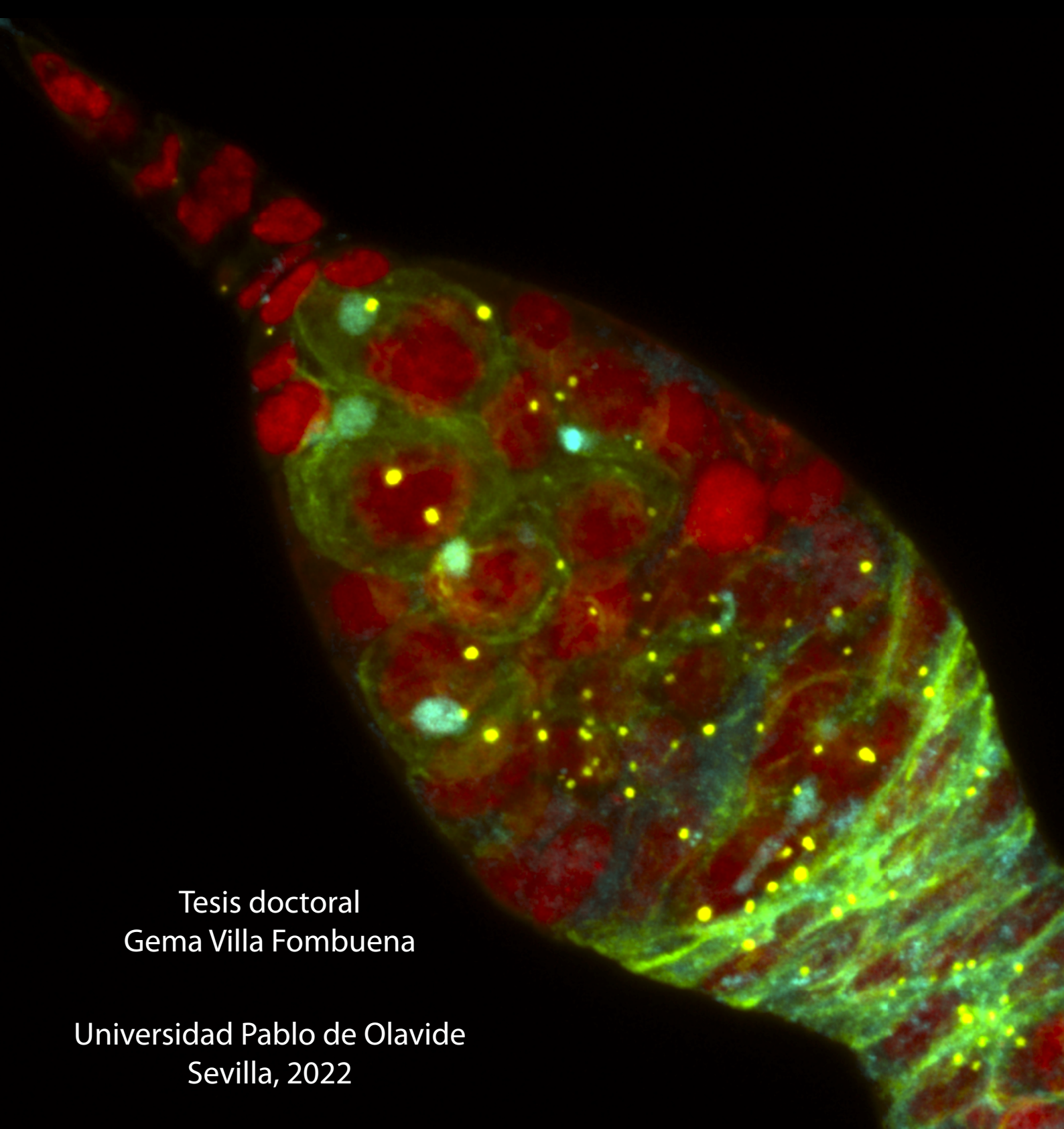


Estudio del ciclo celular de las células troncales
germinales del ovario de *Drosophila melanogaster*:
papel del regulador de matriz extracelular Timp



Tesis doctoral
Gema Villa Fombuena

Universidad Pablo de Olavide
Sevilla, 2022

Imagen de portada:

Imagen de microscopía confocal de un germario adulto de *Drosophila melanogaster* en el que se observan microtúbulos en verde (GFP:: α -Tubulin), centrosomas en amarillo (YFP::Asterless), núcleos en rojo (Histone:: α -RFP) y espectrosomas en cian (anti-Hts).



U N I V E R S I D A D

**PABLO[®]
OLAVIDE**

S E V I L L A

**Estudio del ciclo celular de las células troncales
germinales del ovario de *Drosophila melanogaster*:
papel del regulador de matriz extracelular Timp**

Memoria de Tesis presentada por Gema Villa Fombuena para optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide. Tesis inscrita en el Programa de Doctorado en Biotecnología, Ingeniería y Tecnología Química.

Director:

Acaimo González Reyes

Sevilla, 2022



Este trabajo ha sido realizado en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (Universidad Pablo de Olavide-Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Junta de Andalucía) y ha sido financiado por:

-Proyecto del Plan Nacional I+D de Investigación titulado "Análisis Genético, Molecular y Celular de las células troncales del ovario y de la morfogénesis epitelial de *Drosophila*". Código de referencia: BFU2015-65372-P. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Gobierno de España.

-Proyecto del Plan Nacional I+D de Investigación titulado "Análisis Genético, Molecular y Celular del nicho de células troncales del ovario y de la morfogénesis epitelial de *Drosophila*". Código de referencia: PGC2018-097115-B-I00. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Gobierno de España.

-Proyecto del Programa María de Maeztu titulado "Decision making in Cell Collectives (DMC2)". Código de referencia: MdM-2016-0687. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Gobierno de España.

El Dr. Acaimo González Reyes, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en calidad de Director certifica que:

El trabajo realizado por la doctoranda Gema Villa Fombuena titulado “Estudio del ciclo celular de las células troncales germinales del ovario de *Drosophila melanogaster*: papel del regulador de matriz extracelular Timp”, ha sido realizado bajo su dirección y supervisión, y reúne, a su juicio, las condiciones de originalidad y calidad necesarias para constituir una Tesis doctoral y optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the bottom.

Director:

Acaimo González Reyes

A mi familia

ABREVIATURAS

bam	<i>bag of marbles</i>
BM	Membrana basal (del inglés <i>Basement Membrane</i>)
CB	Cistoblasto
Col	Colágeno
CpC	Célula Cap (del inglés <i>Cap Cell</i>)
Df	Deficiencia
DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés <i>Desoxiribonucleic Acid</i>)
Dpp	Decapentaplegic
EC	Célula escolta (del inglés <i>Escort Cell</i>)
ECM	Matriz extracelular (del inglés <i>Extracellular Matrix</i>)
FC	Célula folicular (del inglés <i>Follicle Cell</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (del inglés <i>Green Fluorescent Protein</i>)
GSC	Célula troncal germinal (del inglés <i>Germline Stem Cell</i>)
Hts	Hu-li-tai-shao
JAK/STAT	Janus kinase /Signal transduction and activator of transcription
MMP	Metaloproteínasa de matrix (del inglés <i>Matrix Metalloproteinase</i>)
n	Tamaño de muestra
NB	Neuroblasto
NEP	Permeación de la envoltura nuclear (del inglés <i>Nuclear Envelope Permeation</i>)
RFP	Proteína roja fluorescente (del inglés <i>Red Fluorescent Protein</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (del inglés <i>Ribonucleic Acid</i>)
ROI	Región de interés (del inglés <i>Region Of Interest</i>)
TC	Célula de transición (del inglés <i>Transition Cell</i>)
TF	Filamento terminal (del inglés <i>Terminal Filament</i>)
Timp	Tissue inhibitor of metalloproteinases
UAS	Upstream Activating Sequence
Upd	Unpaired
Vkg	Viking
YFP	Proteína amarilla fluorescente (del inglés <i>Yellow Fluorescent Protein</i>)

ÍNDICE

RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN	10
1. Las células troncales adultas y sus nichos.....	11
1.1. Comportamiento del ciclo de células troncales	13
1.2. La ECM en nichos de células troncales	14
2. El nicho de células troncales germinales del ovario de <i>Drosophila</i> como modelo	17
2.1. Mantenimiento de GSCs en el nicho.....	19
2.2. Regulación de la ECM en el ovario	21
OBJETIVOS.....	25
CAPÍTULO I. Avances en la descripción de las GSCs silvestres de la hembra de <i>Drosophila</i> como modelo de células troncales en su nicho natural.....	26
I.1. RESULTADOS.....	27
I.1.1. Confirmación del comportamiento dinámico del espectrosoma mediante observación <i>ex vivo</i> ...	27
I.1.2. La kinasa Par-1 se libera del espectrosoma y el fusoma durante mitosis	32
I.1.3. Incorporación de nuevo material en el espectrosoma en crecimiento de GSC y CB	33
I.1.4. El midbody post-abscisión se fusiona con el espectrosoma “round-G2”	36
I.1.5. Excepciones a las observaciones previas: espectrosomas posteriores en la GSC.....	37
I.1.6. Cuantificación del ciclo celular de las GSCs utilizando Fly-FUCCI y la morfología del espectrosoma	39
I.1.7. Eventos durante la división de las GSCs	44
I.1.8. La separación del centrosoma en G1 ocurre sin duplicación de centriolos	48
I.1.9. Los centrosomas anterior y posterior muestran dinámicas distintas en GSCs premitóticas	50
I.1.10. Las GSC tumorales se dividen simétricamente.....	54
I.2. DISCUSIÓN	58
CAPÍTULO II. Implicaciones de proteínas reguladoras de la matriz extracelular en células troncales: observación del comportamiento de GSCs mutantes <i>tim^p</i>	62
II.1. RESULTADOS.....	63
II.1.1. La duración de la división celular de las GSCs no es superior en mutantes <i>tim^p</i>	63
II.1.2. Los centrosomas anterior y posterior premitóticos son menos dinámicos en GSCs <i>tim^p</i>	66
II.1.3. La progresión del ciclo celular está alterada en GSCs mutantes <i>tim^p</i> de 1 semana: sus fases G1 + S tienen mayor duración	68
II.1.4. Presencia de daño en DNA y actividad de p53 en GSCs mutantes <i>tim^p</i>	73
II.2. DISCUSIÓN	86
CONCLUSIONES.....	91

MATERIALES Y MÉTODOS	93
1. Genética.....	94
1.1 Líneas de <i>Drosophila melanogaster</i>	94
1.2. Sistema GAL4/UAS en <i>Drosophila</i>	95
1.3 Regulación de la expresión génica	96
1.4 Envejecimiento	97
2. Microscopía.....	97
2.1. Cultivo ex vivo de germarios de <i>Drosophila</i>	97
2.2. Microscopía de muestra viva	99
2.3. Tinciones inmunohistoquímicas.....	99
2.4. Microscopía de muestra fijada	100
3. Análisis de datos	100
3.1. Análisis de la morfología del espectrosoma	100
3.2. Seguimiento del movimiento de centrosomas	101
3.3. Cuantificación de intensidad de fluorescencia	101
3.4. Análisis estadístico	102
BIBLIOGRAFÍA.....	103
AGRADECIMIENTOS.....	116

RESUMEN

En el desarrollo embrionario y en el mantenimiento de tejidos adultos es esencial que se generen nuevas células que contribuyan al crecimiento y reparación de los tejidos cuando sea necesario. Para ello, los eucariotas superiores poseen poblaciones de células indiferenciadas, capaces tanto de autorrenovarse como de dar lugar a uno o varios tipos celulares diferentes; éstas son las llamadas células troncales. Las células troncales se suelen encontrar en microambientes especializados o nichos que regulan su capacidad de proliferación y evitan su diferenciación. Así, para el desarrollo y mantenimiento de los tejidos son claves tanto la correcta actividad de las células troncales como la de los nichos. Los nichos están formados por células de soporte y/o una matriz extracelular especializada. Esta tesis doctoral se centra en estudiar la influencia que la matriz extracelular puede ejercer sobre el comportamiento de las células troncales, utilizando para ello un modelo de células troncales adultas en su nicho natural, el nicho de células troncales germinales (GSCs, del inglés *germ line stem cells*) del ovario de *Drosophila melanogaster*.

En primer lugar, este trabajo profundiza en la caracterización de algunos parámetros del ciclo celular de las GSCs en condiciones silvestres. Se detallan especialmente parámetros para los que no existe un consenso claro en la literatura, gracias a observaciones directas *ex vivo*. Parámetros como el comportamiento del espectrosoma, orgánulo específico de GSCs cuya morfología varía a lo largo del ciclo celular; comportamiento de marcadores de ciclo para detallar la progresión de las fases mediante el uso de la herramienta Fly-FUCCI (del inglés *fluorescence ubiquitination cell cycle indicator*); dinámica de espectrosomas; y eventos asociados a la división de estas células GSCs.

En segundo lugar, se estudia el papel que la proteína reguladora de matriz extracelular Timp (del inglés *tissue inhibitor of metalloproteinases*) podría tener en el comportamiento de las GSCs, analizando la actividad de estas células en un contexto de ausencia de dicha proteína. En esta tesis se ha observado que la ausencia de Timp no afecta a la división de las GSCs, pero sí produce una alteración en la progresión del ciclo celular de estas células troncales, en las que también se observa una acumulación de daño genómico que podría estar desencadenando dichas alteraciones del ciclo. En ausencia de Timp, los ovarios de *Drosophila* presentan una menor rigidez del tejido, especialmente en el nicho de GSCs, por lo que esta tesis presenta un análisis de la posible relación existente entre el estado de la matriz extracelular y el comportamiento de células troncales en su nicho.

INTRODUCCIÓN

El trabajo de tesis doctoral recogido en este manuscrito se centra en describir la posible relación existente entre el comportamiento de células troncales adultas y su interacción con el entorno inmediato. Para ello, se ha empleado el animal modelo *Drosophila melanogaster*, concretamente el nicho de células troncales germinales que se encuentra en el ovario de la hembra. En primer lugar, se ha realizado una caracterización detallada de parámetros del ciclo celular del modelo empleado - para los que no existía un consenso claro en la literatura - y, en segundo lugar, se ha partido del análisis de algunos de estos parámetros para estudiar el comportamiento de las células modelo en una situación de menor rigidez de la matriz extracelular del nicho.

Las células troncales adultas son las responsables del mantenimiento y reparación de los tejidos, por lo que un mayor conocimiento de su actividad, y de aquellos factores que pueden alterarla, sería de utilidad para profundizar en la comprensión tanto del funcionamiento normal de estas células como en procesos patológicos, como los tumorales o los relacionados con el envejecimiento. De igual manera, un mayor conocimiento de una función correcta de las células troncales debería contribuir al desarrollo de productos, técnicas o terapias biomédicas que requieran de su manipulación *in vitro*.

1. Las células troncales adultas y sus nichos

Las células troncales se caracterizan por ser células indiferenciadas que pueden autorrenovarse y también generar células específicas de tejido. Los eucariotas superiores poseen poblaciones de células troncales que son esenciales durante el desarrollo embrionario, así como responsables de la homeostasis en los tejidos adultos. Las células troncales mantienen constantemente un cierto potencial de desarrollo que les permite dar lugar a uno o varios tipos celulares de un organismo. De mayor a menor grado de potencialidad, se distinguen las células troncales totipotentes, que pueden generar un individuo completo más los anexos embrionarios; las pluripotentes, que pueden generar células de cualquiera de las tres capas embrionarias; y las multipotentes, que sólo pueden generar tipos celulares de su mismo linaje embrionario (revisado en Morrison et al., 1997; Weissman, 2000). Las células troncales del adulto son de tipo multipotente, es decir, tienen una capacidad limitada para generar otras células, y suelen desarrollar su actividad en microambientes especializados, llamados nichos.

El concepto de nicho fue propuesto por Schofield en 1978 como la localización física en la que residen las células troncales adultas, y donde reciben determinados estímulos y determinan el destino de su progenie (Schofield, 1978). Conforme se ha profundizado en las propiedades de los diferentes nichos descritos desde entonces, se pueden atribuir las siguientes características comunes a todos ellos. En los nichos, las células troncales están físicamente confinadas por células de soporte y/o una matriz extracelular (ECM) especializada. Dentro de estos límites físicos, las células troncales son mantenidas por señales de corto alcance que provienen de las propias células de soporte, y cuyos objetivos son regular la proliferación de las células troncales y evitar su diferenciación. En el nicho, las células troncales pueden dividirse simétricamente, produciendo dos nuevas células troncales, o asimétricamente, lo que resulta en una célula troncal y una célula precursora específica de tejido. Cuando una célula troncal se divide asimétricamente, una de las células hijas abandona el nicho y experimenta divisiones adicionales, amplificando una población de precursoras, que finalmente se diferenciarán por completo a cierta distancia de la célula troncal residente en el nicho. De este modo, los nichos permiten que las poblaciones de células troncales se autorrenueven y, por lo tanto, se perpetúen en el tiempo, permitiendo la homeostasis de los tejidos (revisado en Li & Xie, 2005) (Figura 1; en adelante Fig.).

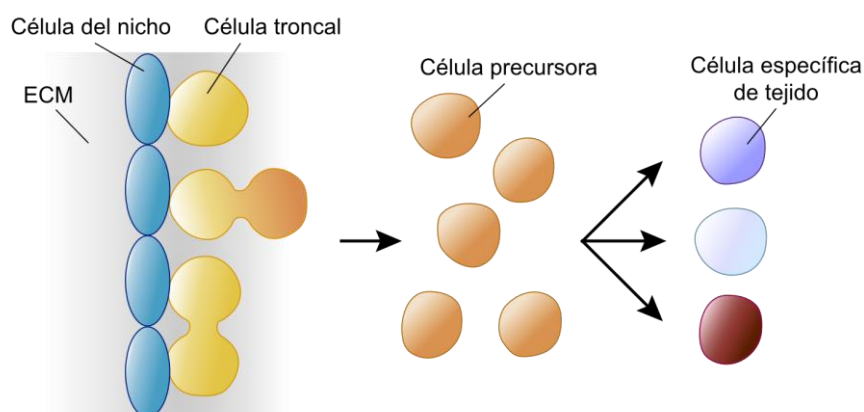


Figura 1. Representación esquemática de un nicho de células troncales adultas. Las células de soporte (azul) y la ECM (gris) del nicho mantienen un contacto directo con las células troncales (amarillo) que albergan, ejerciendo una señalización directa sobre ellas para mantener su estado indiferenciado y regular su actividad. Cuando una célula troncal se divide asimétricamente (división superior), una de las células hijas renueva el linaje de las células troncales mientras que su hermana (naranja) entra en diferenciación. Ésta última puede seguir dividiéndose y generar una población de células precursoras que finalmente darán lugar a uno o varios tipos de célula específicas de tejido (violeta, blanco, marrón). ECM, matriz extracelular.

A pesar de que las células troncales pueden suponer poblaciones pequeñas dentro de los tejidos adultos, lo que complica su análisis, de acuerdo con estas propiedades se han podido identificar diferentes nichos tanto en invertebrados como vertebrados. Existen numerosos trabajos acerca de nichos de células troncales del sistema nervioso, piel, músculo esquelético, epitelio digestivo, línea hematopoyética o línea germinal, tanto en mamíferos como en *Drosophila* o *Caenorhabditis elegans* (revisado en Spradling et al., 2001).

1.1. Comportamiento del ciclo de células troncales

El comportamiento de las células troncales adultas depende del tipo de tejido y de los estímulos que recibe. Por lo tanto, la caracterización tanto de las células troncales como de sus nichos puede ayudar a comprender mejor la homeostasis tisular y los procesos que están relacionados con el desequilibrio de células troncales adultas, como ocurre en el envejecimiento, los deterioros tisulares o el cáncer.

Las células troncales son células mitóticas cuya división está regulada por el nicho, que integra factores como la edad del organismo, el estado nutricional, enfermedad, daño en el tejido, etc. Un ciclo mitótico canónico está formado por cuatro fases: Gap1 o G1, en la que la célula se prepara para la síntesis de DNA; fase de síntesis o S en la que tiene lugar la replicación del material genético; Gap2 o G2 en la que se prepara la división; y fase de mitosis o M, en la que finalmente se reparte el material genético entre las dos células hijas resultantes de la división. La transición de una fase del ciclo a la siguiente está mediada principalmente por los complejos formados por ciclinas (Cyc) y kinasas dependientes de ciclinas (Cdks). En los eucariotas superiores, la progresión de la Fase G1 está regulada por la acción de los complejos CycD-Cdk4/Cdk6 y la entrada hacia fase S por CycE-Cdk2. En fase S, la acción de la ciclina mitótica CycA promueve la entrada en G2 en el complejo CycA-Cdk2. Finalmente, en fase G2, la interacción de Cdk1 con las ciclinas mitóticas CycA y CyB promueven el inicio de mitosis (revisado en Noatynska et al., 2013; Uhlmann et al., 2011).

Los altos niveles de CycE en fase G2 parecen ser una característica común a algunos tipos de células troncales, en los que, como consecuencia, la fase G1 del próximo ciclo transcurre con una breve duración. En *D. melanogaster*, las divisiones embrionarias sincitiales y las divisiones de histoblastos en metamorfosis tienen lugar sin que se observe fase G1 debido a acumulaciones de CycE (Ninov et al., 2009; Richardson et al., 1993). Las células germinales de la gónada de *C. elegans* se dividen rápidamente sin apenas fase G1, también como resultado

de los altos niveles de CycE presentes durante todo el ciclo (Fox et al., 2011). En células troncales embrionarias de mamífero la CycE se expresa de forma constitutiva, teniendo una fase G1 de muy corta duración (revisado en Singh & Dalton, 2009).

El aumento y disminución controlados de los niveles de ciclinas son necesarios para asegurar la correcta progresión del ciclo, de manera que siempre la síntesis de DNA preceda a la división. Además, existen también mecanismos que velan por la integridad y tamaño correctos del genoma durante su replicación. Tanto la progresión del ciclo como la monitorización del estado del genoma quedan bajo la acción de los puntos de control o *checkpoints* celulares. Éstos desencadenan o detienen la transición de una fase celular a la siguiente en función de que la célula haya conseguido superar correctamente los hitos que debían ocurrir durante la fase en cuestión; dichos hitos pueden ser la duplicación de orgánulos, el aumento de tamaño celular o la replicación y reparación del DNA. Durante el ciclo, los niveles de ciclinas se ven afectados por las diferentes cascadas de señalización que confluyen en cada *checkpoint* y que integran estímulos intra y extracelulares. Un estímulo intracelular común a todos los *checkpoints* de transición de fase (transiciones G1/S, intra-S y G2/M) es la presencia de daño en DNA, ya que es un objetivo primordial comprobar y asegurar la calidad del material genómico antes, durante y tras la replicación del DNA que se va a transmitir a las células hijas. Los principales grupos de proteínas sensores de daño en DNA, como son ATM/Chk2 y ATR/Chk1, pueden iniciar diversas cascadas de respuesta ante este daño que conducen a la activación de la proteína supresora de tumores p53. Una vez activada, p53 estaría involucrada a su vez en la inactivación de las Cdks, a través de la inducción de p21 (inhibidor de Cdk2 y Cdk4), para así detener la progresión del ciclo de G1 a S, la replicación de DNA en S o la entrada en mitosis en G2/M (revisado en Walworth, 2000).

1.2. La ECM en nichos de células troncales

La ECM de cualquier tejido consiste en una red altamente regulada de biopolímeros secretados por células, siendo estos biopolímeros esencialmente proteínas, proteoglicanos y glucosaminoglicanos, tales como Lamininas, Colágenos, Fibronectinas, Nidógenos o Heparán-sulfato-proteoglicanos, entre otros. La ECM juega un papel esencial en la gran mayoría de los nichos de células troncales estudiados, ya que interviene en el mantenimiento, la proliferación y la diferenciación de las células troncales (revisado en Gattazzo et al., 2014 y Stowers, 2021).

La ECM es un compartimento dinámico en el que la remodelación controlada de sus componentes interviene en el desarrollo, funcionamiento y reparación de los tejidos. Desde el punto de vista molecular, la ECM participa en la señalización de células troncales, bien uniéndose directamente a receptores de la superficie celular o bien presentándoles moléculas de señalización que no forman parte de la composición propia de la ECM (revisado en Gattazzo et al., 2014). En este sentido, la ECM puede actuar como un reservorio de moléculas de señalización, reteniéndolas, insolubilizándolas o inactivándolas, y por tanto limitando su acción, o puede, por el contrario, favorecer su dispersión y llegada a las células con las que está en contacto (revisado en Hynes, 2009).

Participando en la modulación del alcance de moléculas de señalización, en la ECM también se encuentran enzimas reguladoras como las metaloproteinasas (MMPs). Las MMPs son enzimas proteolíticas capaces de degradar la mayoría de los componentes de la ECM, promoviendo así su renovación (revisado en Page-McCaw et al., 2007). Además, la acción de las metaloproteinasas solubiliza las moléculas de señalización, permitiendo su distribución (revisado en Page-McCaw et al., 2007). El papel remodelador de las MMPs interviene de forma fundamental en procesos de desarrollo y regeneración, como se ha descrito en la morfogénesis de estructuras ramificadas, en angiogénesis y en el cierre de heridas (revisado en Nissinen & Kähäri, 2014; Vu & Werb, 2000). Estas enzimas proteolíticas pueden degradar colágeno fibrilar (colagenasas), colágeno desnaturalizado (gelatinasas) u otros componentes de la ECM como la fibronectina. Esta actividad de las MMPs está regulada por la familia de proteínas *Tissue inhibitor of metalloproteinases* o TIMPs, las cuales se secretan y pueden unirse de forma no covalente a las MMPs para bloquear su actividad catalítica (revisado en Arpino et al., 2015). Se han descrito diversos procesos patológicos que implican un desequilibrio entre la actividad de TIMPs y MMPs, como los relacionados con defectos en el desarrollo renal o en el ciclo del folículo ovárico (revisado en Haas et al., 2004; Smith et al., 2002).

Las propiedades físicas de la ECM también modulan la actividad de las células troncales con las que está en contacto, ya que propiedades como la rigidez, porosidad, topografía o solubilidad de la ECM intervienen en procesos relacionados con el anclaje celular a la matriz, el mantenimiento de la polaridad del tejido, la división o la migración celular (revisado en Gattazzo et al., 2014; Reilly & Engler, 2010). En concreto, la rigidez de la ECM es un importante estímulo para la célula, la cual puede percibir las fuerzas del medio externo y responder de una forma adecuada a través del fenómeno de la mecanotransducción. En la mecanotransducción, una compleja maquinaria mecanosensora formada por integrinas,

adhesiones focales, citoesqueleto, envoltura nuclear y nucleoesqueleto determina la reacción celular a las fuerzas generadas en la ECM (DuFort et al., 2011; A. Mammoto et al., 2012; T. Mammoto & Ingber, 2010). Concretamente, la conexión entre el citoesqueleto y el nucleoesqueleto está mediada por el complejo *linker of nucleoskeleton and cytoskeleton* (LINC), que incluye proteínas SUN y nesprinas. Las proteínas con dominio SUN se asocian a la membrana nuclear interna, conectando con diferentes componentes de la lámina nuclear; las proteínas tipo nesprinas se unen a la membrana nuclear externa e interaccionan con elementos del citoesqueleto como microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios (Lombardi et al., 2011; Sosa et al., 2012). Dentro de sus funciones de mecanotransducción, el complejo LINC juega un papel relevante en la respuesta a daño en DNA (revisado en Lambert, 2019). Estudios en células humanas y en *C. elegans* indican que el complejo LINC contribuye a reparar roturas de doble cadena en el DNA o DSBs (*double strand breaks*). Tanto la proteína humana SUN1 como su homólogo en *C. elegans* UNC-84 interaccionan con las proteínas de reparación de DNA Ku70/Ku80 y DNA-PK (*DNA protein kinase*) para desencadenar la inhibición de la recombinación no homóloga y estimular la homóloga, promoviendo la acumulación de RAD51 en la zona de DSBs (Lawrence et al., 2016); RAD51 está involucrada en la invasión de cadena y búsqueda de similitud de secuencia en recombinación homóloga (revisado en Chapman et al., 2012). El complejo LINC también puede intervenir en la respuesta a daño a DNA promoviendo la movilidad de los DSBs, ayudando a su reparación (Lottersberger et al., 2015). De hecho, se ha observado que regiones de cromatina dañada por presencia de DSBs tienen una mayor movilidad en la que están involucradas la proteína de bloqueo de resección de extremos 5' 53BP1 y las proteínas LINC SUN1 y SUN2. Se ha propuesto que esta movilidad dependiente de 53BP1 está mediada por la asociación de las nesprinas del complejo LINC con microtúbulos, lo que permite transferir las fuerzas del citoesqueleto al interior del núcleo, y promover así el movimiento de cromatina que favorece la acción de 53BP1 (Lottersberger et al., 2015).

La influencia de la ECM en el comportamiento de células troncales se ha constatado especialmente en trabajos de ingeniería tisular en los que se eliminan todas las células de un tejido para obtener únicamente la matriz y comprobar, a continuación, cómo esta ECM contienen información suficiente para guiar a células troncales exógenas en la especificación hacia células propias del tejido que fue descelularizado previamente (revisado en J. J. Song & Ott, 2011). La rigidez del medio también condiciona el comportamiento de células *in vitro*, cómo se ha descrito en estudios con células mesenquimales humanas que, cultivadas en sustratos con elasticidad equiparable a la encontrada en cerebro, músculo o hueso, experimentan

diferenciación a neuronas, mioblastos y osteoblastos, respectivamente (Engler et al., 2006). También se ha observado *in vivo* cómo pequeñas modificaciones en la rigidez de los músculos, a través de deposición de colágeno VI por fibroblastos, pueden afectar la renovación y el mantenimiento de células satélite (las células troncales de los músculos) (Urciuolo et al., 2013)

En definitiva, las propiedades bioquímicas y biofísicas de la ECM están tan interconectadas como la propia relación de la ECM con la célula. Las células están continuamente monitorizando y remodelando la ECM, a la vez que estas modificaciones acaban por afectar al comportamiento celular. Por lo tanto, la remodelación incorrecta de alguno de los componentes de la ECM, o bien de los mecanismos que la regulan, va a tener efectos en sus propiedades bioquímicas, biofísicas y biomecánicas, generando un medio extracelular alterado que podría afectar a su vez a la homeostasis y función del tejido.

2. El nicho de células troncales germinales del ovario de *Drosophila* como modelo

Drosophila presenta un modelo interesante para estudiar el comportamiento de células troncales dentro de su nicho natural: el nicho de células troncales de la línea germinal que se encuentra en el ovario de la hembra.

La hembra de *Drosophila* posee dos ovarios, que ocupan la mayor parte de su abdomen. Un ovario está formado por 16-18 ovariolas, cada una de las cuales consiste, a su vez, en una concatenación de cámaras huevo en progresiva maduración; las cámaras huevo pasan por 14 estadios de desarrollo hasta dar lugar finalmente al huevo maduro de *Drosophila* (Fig. 2). En el extremo anterior de cada ovariola, encontramos el germario, la estructura que genera las cámaras huevo (Spradling & Lin, 1993; Xie & Spradling, 2000).

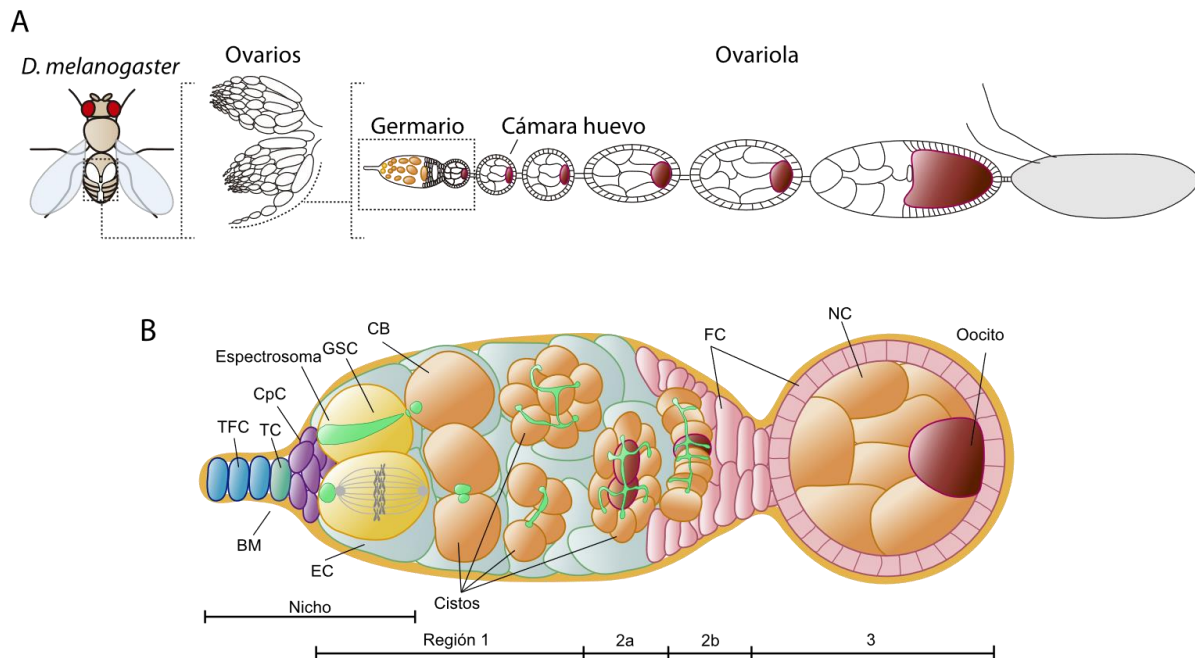


Figura 2. El ovario de *Drosophila* como modelo de nicho de células troncales adultas. **(A)** Representación esquemática de la hembra de *Drosophila*, ovarios y ovariola. **(B)** Detalle de la estructura del germario. La asociación de uno de los centrosomas de la GSC con el espectrosoma apical garantiza que una de las células hijas de la GSC permanece en contacto con las CpCs. TFC, célula del filamento terminal (azul); TC, célula de transición (verde); CpC, célula Cap (morada); BM, membrana basal (amarillo oscuro); GSC, célula troncal germinal (amarillo claro); CB, cistoblasto y cistos (naranja); EC, célula escolta (verde claro); FC, célula folicular (rosa claro); NC, célula nutricia (naranja); oocito (marrón). En color verde se representan espectrosomas y fusomas, en gris huso mitótico y centrosomas.

En la parte anterior del germario se sitúa el nicho de las células troncales de la línea germinal (GSCs, del inglés *Germline Stem Cells*). Este nicho presenta tres tipos de células somáticas: células del filamento terminal (TF, del inglés *Terminal Filament*), células “cap” (CpCs, del inglés *Cap Cells*) y células escolta (ECs, del inglés *Escort Cells*). Concretamente, el nicho está formado por un TF de 8-10 células, una roseta de 6-8 CpCs conectadas al TF por una célula de transición (TC, del inglés *Transition Cell*), 2-3 ECs en contacto directo con las CpCs y una ECM especializada llamada membrana basal (BM, del inglés *Basement Membrane*) que rodea tanto el germario como toda la ovariola (Díaz-Torres et al., 2021; Panchal et al., 2017; X. Wang & Page-McCaw, 2018).

El nicho contiene de 2 a 4 GSCs, que son células de gran tamaño, siempre en contacto con las CpCs. Las GSC y las CpC están unidas gracias a uniones adherentes mediadas por

Cadherinas, las cuales mantienen a las GSCs ancladas en el nicho, impidiendo así que las células troncales lo abandonen, especialmente durante la división (X. Song et al., 2002). Las GSCs se caracterizan especialmente por poseer un orgánulo específico llamado espectrosoma, orientado habitualmente también hacia las CpCs. Este orgánulo es rico en material vesicular y proteínas asociadas como la kinasa serina treonina Par-1 y los componentes esqueléticos de membrana α -Spectrin y Hu-li tai shao (Hts), homólogo de la aducina en mamíferos (Huynh et al., 2001; Lighthouse et al., 2008; Lin et al., 1994; Yue & Spradling, 1992). El espectrosoma ancla los centrosomas y los husos mitóticos, estableciendo una polaridad celular y definiendo la orientación del plano de división tanto en GSCs como en su descendencia (de Cuevas et al., 1996; Deng & Lin, 1997; Lin et al., 1994; Lin & Spradling, 1995).

En sentido anteroposterior, el nicho se encuentra en la región 1 del germario, donde las GSCs se dividen asimétricamente para dar lugar a una nueva célula troncal y a una célula que inicia el proceso de diferenciación fuera del nicho, llamada cistoblasto (CB). Cada CB se va a dividir hasta 4 veces en la región 1, siendo estas divisiones sincrónicas y con citocinesis incompletas, por lo que a lo largo del germario encontraremos cistos de 2, 4, 8 y 16 células germinales. Tanto las GSCs como los CBs y los cistos están en contacto estrecho con las ECs, quienes encapsulan a los cistos y los transportan hacia el extremo posterior del germario. Durante las divisiones de los cistos, el espectrosoma se ramifica, manteniendo la comunicación entre las células, y pasa a llamarse fusoma. Inicialmente, todas las células de un cisto se comportan de manera similar, pero en la región 2b una de ellas se especificará como oocito y las 15 restantes permanecerán como células nutricias (NCs, del inglés *Nurse Cells*) (Morris & Spradling, 2011). En la región 2b, el cisto se aplanar y se convierte en un disco de una célula de espesor, que se dispone perpendicularmente al eje anteroposterior del germario. Al mismo tiempo, unas células somáticas llamadas foliculares comienzan a rodear al cisto, que acabará adquiriendo una forma esférica y rodeado por una monocapa epitelial denominada epitelio folicular. Finalmente, en la región 3, el cisto germinal rodeado del epitelio folicular está listo para abandonar el germario, constituyendo ya una nueva cámara huevo completa (revisado en Losick et al., 2011; Xie & Spradling, 2000).

2.1. Mantenimiento de GSCs en el nicho

La hembra de *Drosophila* origina cámaras huevo durante toda su vida y el nivel de producción depende, entre otros factores, del mantenimiento de las células troncales del germario. Para

ello, los nichos proporcionan un microambiente de señales de corto alcance e integran factores sistémicos como señalización de insulina, estado nutricional, hormonas esteroideas y envejecimiento, entre otros (Drummond-Barbosa, 2019; Eliazer & Buszczak, 2011).

Con relación a las señales de corto alcance, la comunicación entre CpCs, ECs y GSCs regula la proliferación de las GSCs y evita su diferenciación. Entre las cascadas de señalización activas en el nicho se encuentra la vía de *decapentaplegic (dpp)*, que codifica el ortólogo del factor de crecimiento BMP2/4 en *Drosophila* (Dpp; Fig. 3). El filamento terminal y las CpCs secretan la citoquina Unpaired (Upd), que va a activar la ruta de Jak/Stat en CpCs y en ECs, estimulando la producción del ligando Dpp en estos dos tipos celulares. Dpp señala a las GSCs a través, al menos, de sus receptores Tipo I Thickveins y Saxophone (Tkv y Sax) y Tipo II Punt (Put) (López-Onieva et al., 2008; Rojas-Ríos et al., 2012; L. Wang et al., 2008; X. Wang & Page-McCaw, 2018; Xie & Spradling, 1998) La activación de estos receptores en las GSCs inhibe la transcripción del gen de diferenciación *bag-of-marbles (bam)*, permitiéndoles mantener su estado indiferenciado. La supresión de la señalización de Dpp en el nicho induce la diferenciación de las células troncales y la pérdida del linaje de las GSCs. Por el contrario, el aumento de la señal Dpp genera masas tumorales de células tipo GSC e impide la aparición de fusomas, como se observa tras una sobreexpresión de Dpp o de la forma activada del receptor Tkv en el nicho (Casanueva & Ferguson, 2004; Xie & Spradling, 1998).

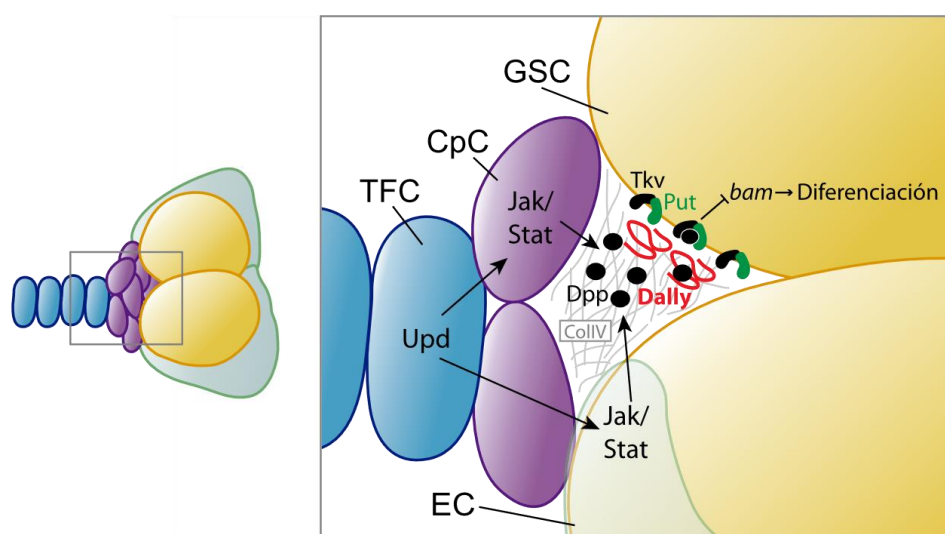


Figura 3. Vía de señalización de Dpp en el nicho de células troncales germinales de *D. melanogaster*. Representación esquemática del nicho (izquierda) y detalle (derecha) del mecanismo de bloqueo de diferenciación de la GSCs por señalización de Dpp. La secreción de Upd en el TF y las CpCs

activa la ruta Jak/Stat en CpCs y ECs, induciendo la producción del ligando Dpp. La difusión de Dpp está regulada por el Col IV y Dally, ambos presentes en la ECM del nicho. La recepción de Dpp en las GSCs está mediada al menos por los receptores Tkv/Put. La activación de la cascada de señalización de Dpp desencadena la inhibición del factor de diferenciación Bam.

El plano de división de las GSCs viene dado por la orientación de su huso mitótico que, a su vez, está determinado por la asociación de uno de los centrosomas de la célula con el espectrosoma. Como el espectrosoma se encuentra localizado en la parte anterior de la GSC en contacto con las CpCs, una de las células hijas de la GSC en división permanece en contacto con las CpCs, mientras que la otra normalmente se aleja un diámetro celular de las CpCs. Además, las divisiones de las GSCs son mayoritariamente asimétricas, al menos en lo que se refiere a la herencia de la mayor parte del espectrosoma por parte de la célula hija que permanece en contacto con las CpCs. Dicha célula hija recibe la señal de Dpp secretada por las CpCs y, por tanto, reprime la expresión del gen de diferenciación *bam*. Por ello, esta célula hija renueva el linaje de célula troncal y asegura el mantenimiento de una población de GSCs en el nicho. La otra célula hija queda fuera de la zona de influencia del nicho y se aleja de la acción de Dpp, activando la transcripción de *bam* y comenzando a diferenciarse como CB. La limitación de la acción de Dpp también está regulada al menos por dos factores. Uno, el componente no celular del nicho, es decir, la ECM especializada que lo rodea y cuya composición difiere de la que se encuentra en el resto del germario. Los colágenos tipo IV Cg25C y Viking (Vkg) se unen a Dpp, limitando su difusión (Wang et al., 2008), pero el heparán-sulfato-proteoglicano Dally, abundante en la zona del nicho, estabiliza a Dpp para facilitar su recepción en las GSCs (Guo & Wang, 2009). Y dos, la emisión por parte de las GSCs de pequeñas proyecciones decoradas con los receptores de Dpp para captar el ligando en su zona de acumulación entre las CpCs (Wilcockson & Ashe, 2019). De esta manera, las señales que bloquean la diferenciación están limitadas al nicho, tanto por ser producidas únicamente por las CpCs y ECs, como porque su rango de acción está restringido gracias a una distribución especializada de la ECM del nicho y a la emisión de micro-proyecciones por las GSCs.

2.2. Regulación de la ECM en el ovario

La membrana basal que rodea cada una de las ovariolas que constituyen los ovarios adultos está compuesta principalmente por Colágeno tipo IV, Laminina, Perlecan y Nidogen (Díaz-Torres

et al., 2021; Van De Bor et al., 2015a) (Fig. 4). Aunque menos detallada hasta la fecha, también existe una matriz intersticial en el nicho, como se deduce de imágenes de microscopía electrónica de transmisión en la que se encuentra material electrodenso rodeando a CpCs y a las zonas de conexión GSC-CpCs (Díaz-Torres et al., 2021; Van De Bor et al., 2015a) (Fig. 4).

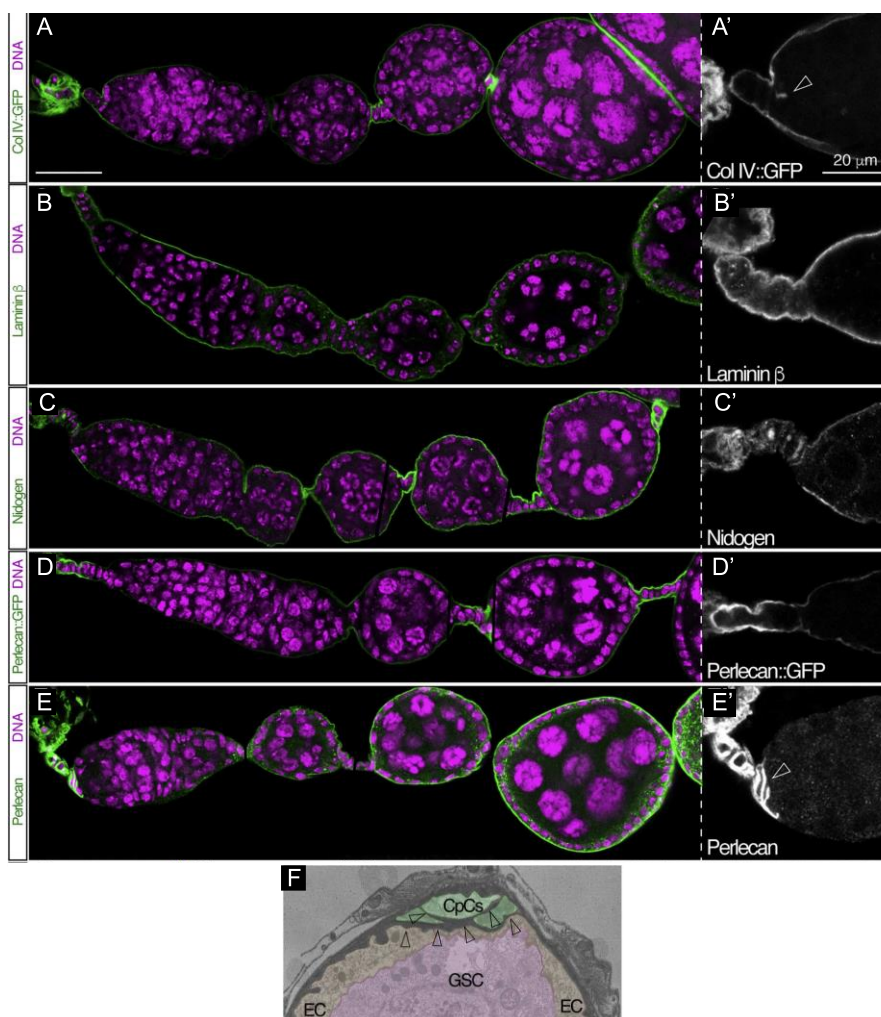


Figura 4. Componentes de la BM en el ovario de *Drosophila* (adaptado de Díaz-Torres et al. 2021). (A-E) Patrones de expresión de la proteína de fusión ColIV::GFP (*vkg::GFP*) (A), anticuerpo anti-Laminina- β (B), anticuerpo anti-Nidogen (C), proteína de fusión Perlecan::GFP (*trol::GFP*) (D) y anticuerpo anti-Perlecan (E). (F) Imagen de microscopía electrónica de transmisión en la que se observa material electrodenso tanto en el contorno del germario (en la imagen sólo se muestra la zona del nicho) como en el espacio intersticial entre CpCs y conexión CpCs-GSC.

Los componentes de la BM del ovario pueden proceder de, al menos, tres orígenes diferentes. Así, en el caso del colágeno IV, los hemocitos embrionarios y larvarios primero depositan ColIV alrededor de los germarios en las gónadas; después, el ColIV secretado por el cuerpo

graso a la hemolinfa se incorpora en las ovariolas; y por último, las células foliculares se encargan de depositar fibras de ColIV en la superficie basal de las cámaras huevo (Bunt et al., 2010; Lerner et al., 2013; Pastor-Pareja & Xu, 2011; van de Bor et al., 2021; Van De Bor et al., 2015b). Aparte de su correcta deposición, una BM funcional depende también de su adecuada remodelación, generalmente mediada por endopeptidasas del tipo MMP. Frente a las veintiséis MMPs y cuatro proteínas TIMPs identificadas en vertebrados, *Drosophila* sólo posee dos MMPs (Mmp1 y Mmp2) y una única proteína TIMP (revisado en Page-McCAw, 2008). Las dos MMPs de *Drosophila* no presentan ningún ortólogo entre las MMPs de mamífero, a diferencia de su inhibidor TIMP que se relaciona con TIMP-3 en mamíferos; no obstante, TIMP de *Drosophila* puede inhibir a MMPs de mamífero, así como las TIMPs de mamífero pueden inhibir a las MMPs de *Drosophila*, lo que indica la conservación de los mecanismos (Llano et al., 2000; Wei et al., 2003).

La eliminación de la actividad de TIMP en *Drosophila* afecta drásticamente a la viabilidad y fertilidad de las hembras, que presentan además defectos morfológicos como tejido autolisado en el abdomen y burbujas en las alas, consistentes con el papel de *timp* en el mantenimiento de la integridad y remodelación de la ECM de los tejidos (Godenschwege et al., 2000). Concretamente, la disminución de la fertilidad característica de hembras mutantes de *timp* está relacionada con afecciones de la homeostasis en el ovario (Pearson et al., 2016). En ovarios nulos para *timp*, Pearson et al. no observó una disposición alterada en los componentes de la BM ColIV, Perlecan, Laminina- β o Laminina- γ , pero sí se describe una disminución en los niveles de las proteínas ColIV de *Drosophila* Cg25C y Vkg, así como una menor rigidez de la BM, especialmente en la zona del nicho. En ausencia de Timp, se alteran los patrones de expresión de las metaloproteinasas Mmp1 y Mmp2, y se produce una mayor actividad colagenasa en toda la BM del germario. Se produce, además, una pérdida progresiva de la estructura del germario a medida que envejecen las hembras, llegando a observarse ovarios de reducido tamaño, con casi nula organización y ovariolas completamente vacías (Pearson et al., 2016) (Figura 5). A pesar de esta fuerte influencia de la actividad de TIMP sobre la homeostasis del ovario, se desconoce el mecanismo por el cual se desencadena este fenotipo.

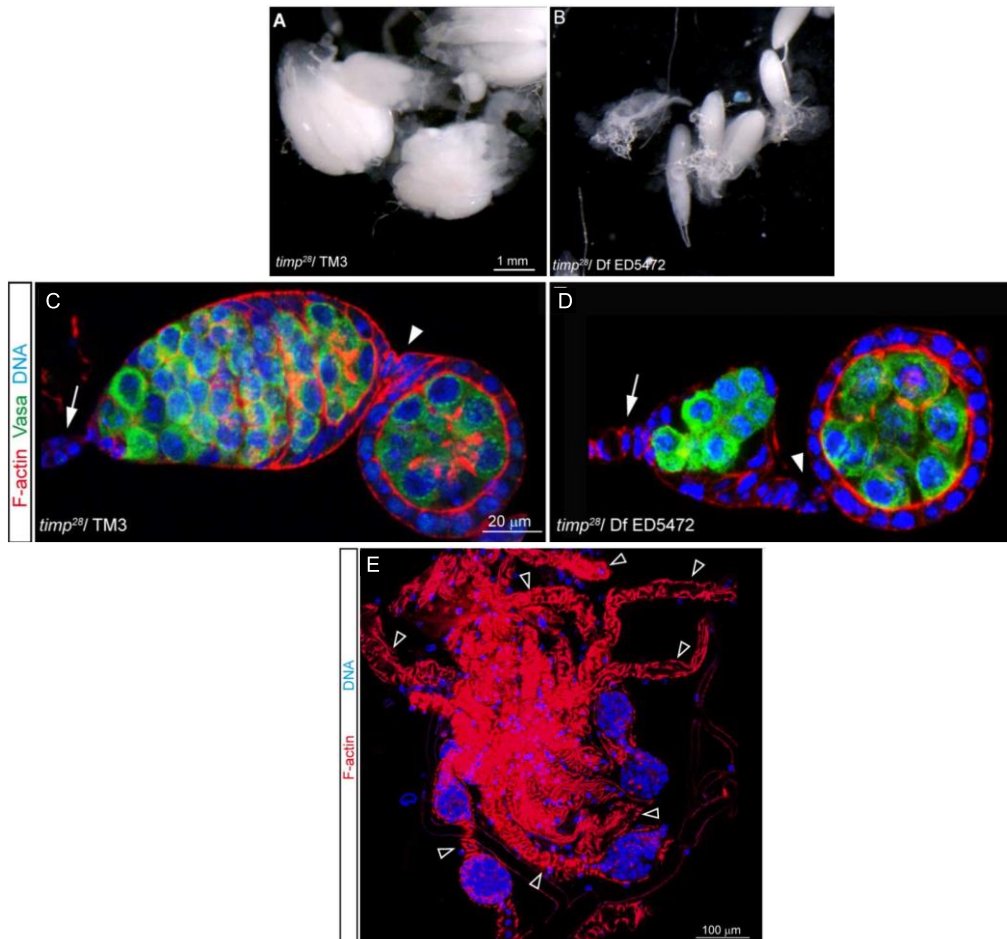


Figura 5. La ausencia de *timp* en el ovario de *Drosophila* provoca alteraciones en la homeostasis del tejido (adaptado de Pearson et al., 2016). (A, B) Ovarios control (A) y ovarios con condición nula de *timp* (B) de hembras de 2 semanas de edad. (C, D) Detalle de germario control (C) y germario mutante *timp* (D). (E) Ovario mutante *timp* de 4 semanas de edad, en el que las puntas de flecha indican ovariolas vacías.

OBJETIVOS

En esta tesis doctoral se plantearon dos objetivos principales:

1. Descripción de las GSCs silvestres de la hembra de *Drosophila* como modelo de células troncales en su nicho natural.
 - 1.1. Análisis *ex vivo* del ciclo del espectrosoma.
 - 1.2. Análisis *ex vivo* del ciclo celular y de eventos durante la división.

2. Caracterización del comportamiento de las GSCs en el nicho del ovario e implicación del estado de la ECM.
 - 2.1. Análisis del ciclo celular de GSCs control y mutantes *tim*.
 - 2.2. Análisis genético y funcional de la relación entre consistencia de la ECM del nicho y el mantenimiento de las GSCs: papel de la reparación de daño al DNA, implicación de p53 y del complejo LINC.

CAPÍTULO I

Avances en la descripción de las GSCs silvestres de la hembra de *Drosophila* como modelo de células troncales en su nicho natural

I.1. RESULTADOS

Para comenzar esta tesis doctoral, se profundizó en la caracterización de determinados parámetros en las GSCs de la hembra de *Drosophila* para los cuales no existía una descripción consensuada en la literatura en el momento, especialmente acerca del comportamiento de estas células *ex vivo*. Los resultados recogidos aquí corresponden al Objetivo 1 de la tesis.

I.1.1. Confirmación del comportamiento dinámico del espectrosoma mediante observación *ex vivo*

El espectrosoma de las GSCs de la hembra de *D. melanogaster* adquiere diferentes formas a lo largo del ciclo celular. Estudios previos basados en muestra fijada describían hasta cinco morfologías distintas para este orgánulo, sin que existiera un consenso claro en cuanto a la sucesión temporal de dichas morfologías (Ables & Drummond-Barbosa, 2013; de Cuevas & Spradling, 1998; Deng & Lin, 1997; Hsu et al., 2008; LaFever et al., 2010). Para analizar de forma más precisa el comportamiento dinámico del espectrosoma, en este trabajo de tesis se llevó a cabo la grabación de sus cambios morfológicos, utilizando muestra viva que expresaba de forma ubicua la proteína de fusión GFP::Par-1, visible en espectrosoma, fusoma y membrana celular; esta proteína de fusión fue realizada con anterioridad por la Dra. Patricia Rojas Ríos en el laboratorio del Dr. Acaimo González Reyes. La señal de GFP::Par-1 permitía también reconocer los eventos de mitosis, ya que se observaba la partición de la membrana celular en dos nuevas membranas, correspondientes a células hijas. Además, previamente se apreciaba la permeación de la membrana nuclear (NEP), propia de profase temprana (Duan et al., 2021), en la que la señal disminuía considerablemente en el espectrosoma y pasaba a inundar el nucleoplasma (Película 1). A lo largo de este trabajo, en todos aquellos análisis en los que se podía distinguir el fenómeno de NEP, este evento marcaba el punto de tiempo de referencia ($t=0'$). Para corroborar la disminución de señal en el espectrosoma y el concomitante incremento de señal citoplasmática en $t=0'$ (NEP) se cuantificó la intensidad de señal GFP::Par-1 antes, durante y después de NEP, tanto en el espectrosoma como en el núcleo, y se confirmó que, cuando tiene lugar el fenómeno de NEP, esta señal disminuye en el espectrosoma hasta el 36.44% de su intensidad inicial y, por el contrario, aumenta a un 216% en el núcleo (Fig. 6).

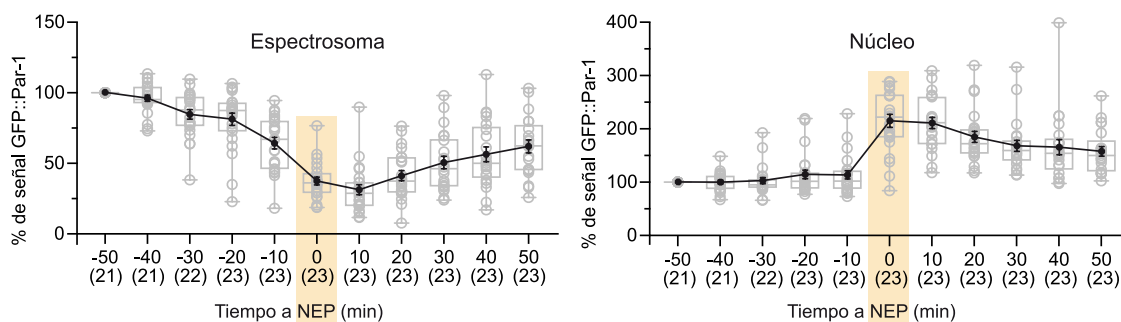


Figura 6. Transferencia de la señal GFP::Par-1 entre espectrosoma y núcleo durante NEP. Cuantificación de la intensidad de señal GFP en espectrosomas y núcleos de 23 GSCs, desde $t=-50'$ a $t=50'$ (NEP, $t=0'$). Los valores individuales se representan como círculos grises en el gráfico de cajas y bigotes. Los valores obtenidos en $t=-50'$ se consideraron el 100% de señal, y el resto de valores se normalizaron respecto a estos. La línea opaca representa la media; las barras de error corresponden al error estándar de la media. La n de cada punto de tiempo analizado se muestra entre paréntesis.

Para el seguimiento de la dinámica del espectrosoma se capturaron 23 GSCs que realizaron mitosis procedentes de 11 germarios diferentes. Las condiciones de cultivo *ex vivo* permitieron la observación de germarios durante aproximadamente 16 horas sin que los nichos presentaran signos evidentes de deterioro celular. En este seguimiento se observó que, tras un evento de NEP, el espectrosoma presentaba una forma redondeada y se situaba en la zona anterior de la célula, en contacto con las CpCs, correspondiendo esta situación a la morfología “round” (Fig. 7, panel superior derecho). A continuación, se formaba una acumulación de material espectrosómico en la conexión intercelular que se mantiene entre GSC y CB tras la mitosis. Esta acumulación tenía inicialmente forma de disco, constituyendo, junto con el espectrosoma redondo anterior, la morfología “plug” (Fig. 7, panel central izquierdo). El disco de material presente en la conexión intercelular comenzaba después a crecer hacia el citoplasma de la GSC, adquiriendo una morfología ovoide. De igual manera, el espectrosoma anterior crecía y se elongaba, dando lugar a la morfología “bar” (Fig. 7, panel central). Ambos trozos de material de espectrosoma entraban finalmente en contacto y se fusionaban, describiendo la morfología “fusing” (Fig. 7, panel central derecho), que se corresponde con un espectrosoma estirado a lo largo del diámetro celular de la GSC. Esta morfología “fusing” se veía luego alterada en la zona de la conexión intercelular GSC-CB cuando ocurría la citocinesis, sufriendo primero un adelgazamiento en este extremo y, posteriormente, una completa abscisión del material que permanecía en el CB, adquiriendo la forma llamada “exclamation point” (Fig. 7, paneles inferiores izquierdo y central). Por último, el espectrosoma con morfología

“exclamation point” se retraía progresivamente hacia las CpCs, hasta adquirir de nuevo una forma redondeada (denominada “round-G2” por producirse en este momento del ciclo celular; ver más abajo) que se mantenía hasta la próxima división celular. (Fig. 7, panel inferior derecho; Película 1).

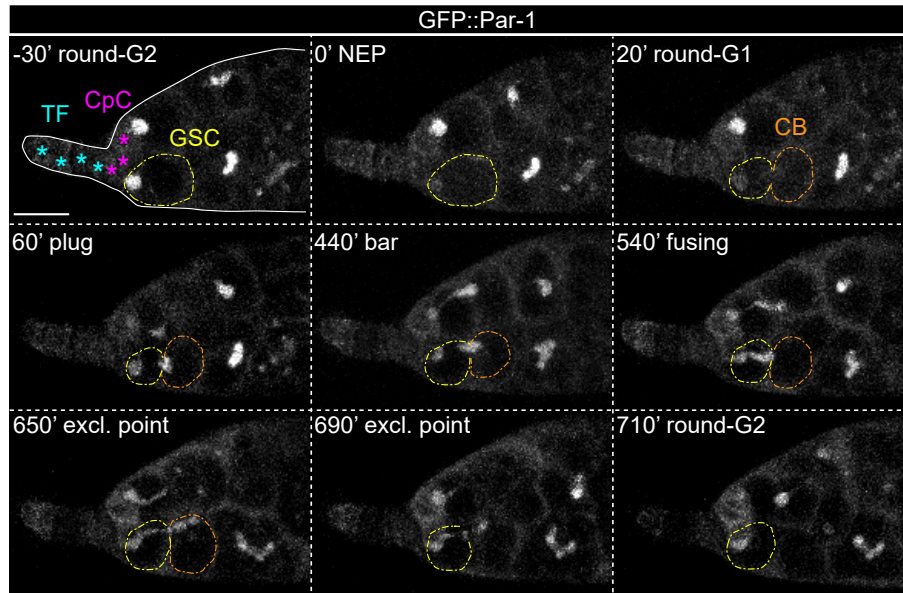


Figura 7. Dinámica *ex vivo* del ciclo del espectrosoma de las GSCs. Fotogramas de la grabación *ex vivo* de un germinario *GFP::par-1* en los que se muestran las diferentes morfologías del espectrosoma de una misma GSC antes y después de mitosis (NEP, $t=0'$). Cada fotograma corresponde a una proyección máxima de 3-8 planos, cada uno de ellos tomados a $1\mu\text{m}$ de distancia en el eje z. La barra de escala corresponde a $10\mu\text{m}$. Relacionada con Película 1.

Estas observaciones confirmaron que la dinámica del espectrosoma de las GSCs de la hembra se corresponde con el siguiente patrón de morfologías: tras una división, al comienzo del ciclo celular, presenta la forma “round” (en este trabajo, se especifica como “round-G1”, por ser G1 la fase que sucede a mitosis), que se convierte en “plug” al aparecer material en la conexión GSC-CB; el crecimiento de ambos cuerpos del “plug” deriva en la forma “bar”, hasta que se produce el contacto y la fusión, generando la morfología “fusing”; finalmente, la citocinesis adelgaza y escinde el espectrosoma dando lugar a un “exclamation point” que, en la GSC, se retrae a la forma redondeada inicial y pasa a llamarse “round-G2” (Fig. 8).

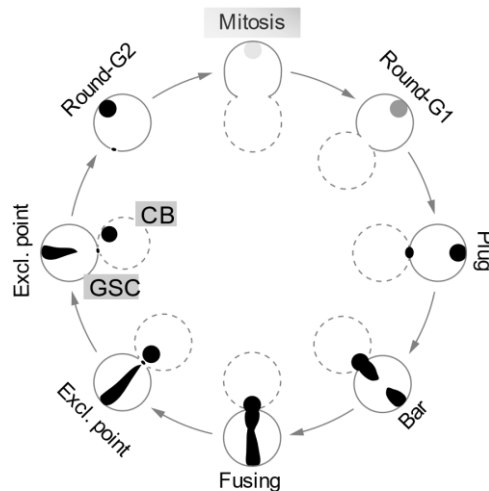


Figura 8. Esquema de las morfologías adoptadas por el espectrosoma a lo largo del ciclo celular de la GSC. Las líneas discontinuas representan el futuro CB. Los espectrosomas en mitosis y en fase G1 temprana se muestran en tono grises para representar la liberación de GFP::Par1 al citoplasma.

Estas observaciones también permitieron cuantificar la duración de cada una de las morfologías del espectrosoma. Se analizaron 27 GSCs, procedentes de 15 germarios diferentes, en las que se podía observar cómo el espectrosoma transitaba por, al menos, tres morfologías consecutivas (por ejemplo, de “plug” a “bar” y a “fusing”), pudiéndose cuantificar así la duración total de la morfología intermedia (en el ejemplo propuesto, la duración de “bar”). La resolución temporal de este análisis estaba limitada por los parámetros de microscopía confocal utilizados, ya que se estableció una toma de imágenes en intervalos de 10 minutos para minimizar el fotoblanqueo de la señal de GFP. Todas las morfologías “round-G1” ocurrían en dos puntos de tiempo, siendo su duración media, por tanto, de 20 min ($n=5$). El resto de morfologías presentaban unos valores de duración menos uniformes: “plug” podía durar de 30 a 80 minutos ($46\pm 8.72'$, $n=5$), “bar” 30-300 minutos ($162\pm 51.13'$, $n=5$), “fusing” 50-280 minutos ($172.5\pm 4.80'$, $n=5$), “exclamation point” 110-300 minutos ($205\pm 22.68'$, $n=8$) y “round-G2” 70-450 minutos ($300\pm 63.09'$, $n=5$). (Fig.9A). Aunque la dispersión de los valores medios para cada fase del espectrosoma es considerable, ésta refleja una variabilidad real de la dinámica del espectrosoma. De hecho, se pudieron identificar GSCs pertenecientes a un mismo germario y que mostraban duraciones diferentes de morfologías concretas. Por ejemplo, GSCs vecinas arrojaron valores de 40 min y 80 min para la forma “plug”, 30 min y 230 min o 190 min y 300 min para “bar”, 50 min y 280 min o 160 min y 200 min para “fusing”, 210 min y 290

min para “exclamation point”, y 70 min y 450 min o 290 min y 450 min para “round-G2” (Fig.9B).

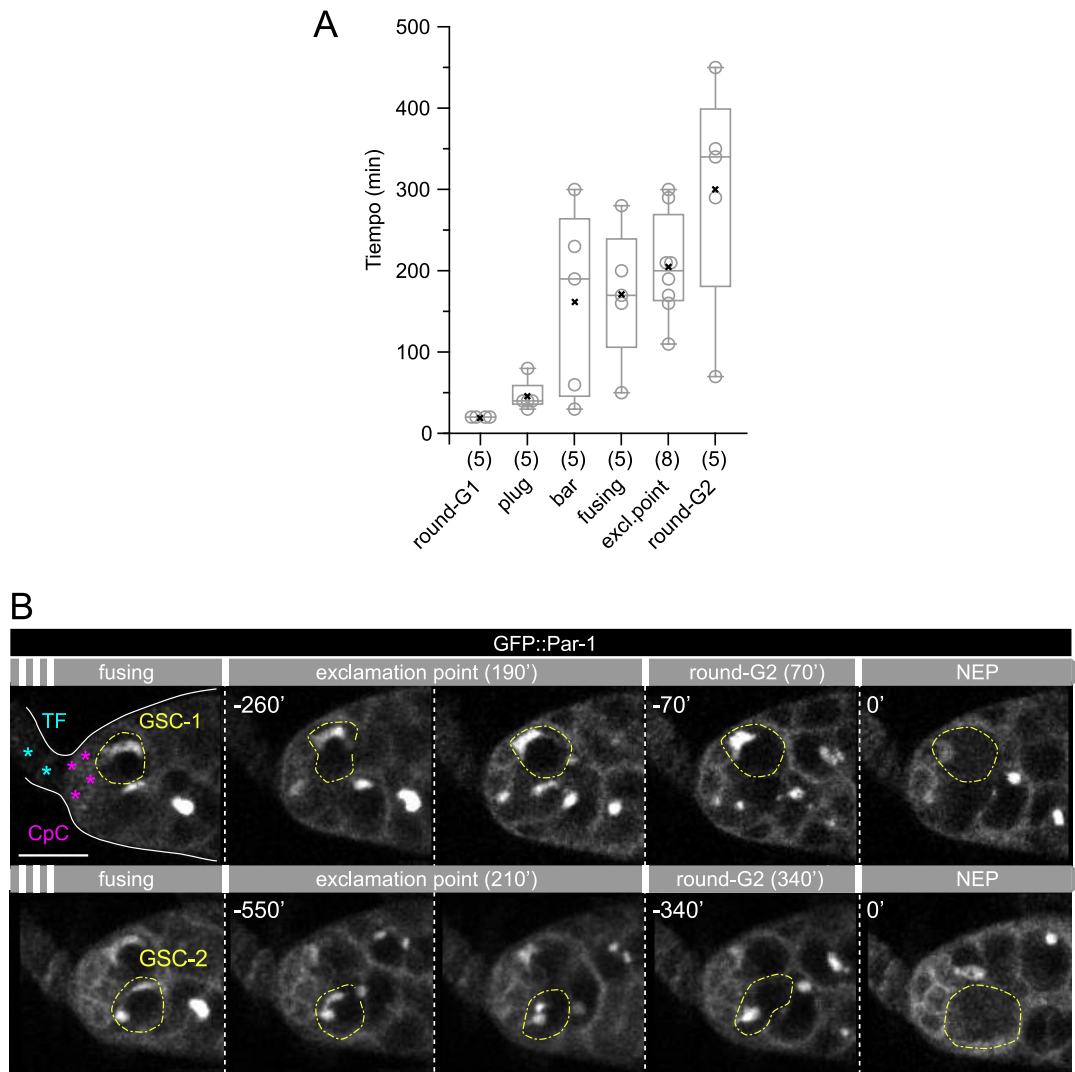


Figura 9. Duración de las morfologías del espectrosoma de GSCs *ex vivo*. (A) Cuantificación de la duración de cada morfología en 15 germarios. Los valores individuales se representan como círculos grises en el diagrama de cajas y bigotes. La media se representa con una cruz y la mediana con una línea horizontal. La n se muestra entre paréntesis. (B) Fotogramas de la captura *ex vivo* de un germario *GFP::par-1* que contiene dos GSCs cuyos espectrosomas transitan por “fusing”, “exclamation point” y “round-G2”, hasta experimentar NEP ($t=0'$). La duración de la morfología “exclamation point” es similar en ambas, mientras que “round-G2” tiene una extensión muy diferente. Los puntos de tiempo mostrados corresponden al momento inicial de cada morfología y la duración de las mismas se muestra entre paréntesis. Cada fotograma corresponde a una proyección máxima de 3-8 planos, cada uno de ellos tomado a $1\mu\text{m}$ de distancia en el eje z. La barra de escala corresponde a $10\mu\text{m}$.

Atendiendo a la duración media de las morfologías, un ciclo completo tiene un valor medio de 15.5 horas. Estimaciones previas publicadas por otros autores indicaban que GSCs cultivadas con medio suplementado con insulina se dividían aproximadamente cada 12-14 horas (Morris & Spradling, 2011).

I.1.2. La kinasa Par-1 se libera del espectrosoma y el fusoma durante mitosis

Como se ha mencionado anteriormente, en el análisis de la dinámica del espectrosoma se comprobó que la señal GFP::*Par-1* de los espectrosomas “round-G2” disminuía durante la transición G2-M-G1, mientras que dicha señal aumentaba en el nucleoplasma. Para estudiar este evento con mayor detalle, se tomaron imágenes *ex vivo* de germarios GFP::*par-1* en intervalos de tiempo cortos, cada 1,5 minutos. Esto mostró que la intensidad de señal GFP::*Par-1* en el espectrosoma comenzaba a disminuir en torno a los 10 minutos previos a NEP ($t=-10'$). Durante NEP ($t=0'$), la señal, ya disminuida en el espectrosoma, traspasaba al espacio intranuclear, indicando una liberación desde el espectrosoma hacia este espacio. Tras la mitosis y la restauración de la integridad de la envoltura nuclear, la señal GFP::*Par-1* se recuperó en todos los casos y el espectrosoma “round-G1” era visible aproximadamente 20 minutos tras NEP (Fig. 10, Película 2).

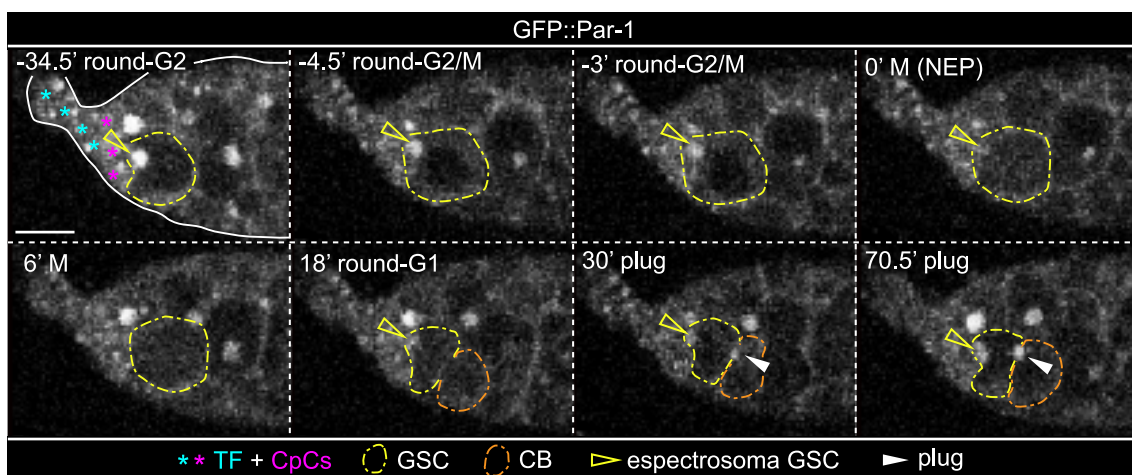


Figura 10. GFP::*Par-1* se libera del espectrosoma mitótico. Fotogramas de la grabación *ex vivo* de un germario GFP::*par-1* en los que se observa la pérdida de la señal GFP::*Par-1* en el espectrosoma de una GSC durante mitosis y la pronta recuperación de esta señal en el espectrosoma “round-G1” y en el “plug” (NEP, $t=0'$). Cada fotograma corresponde a una proyección máxima de 3-8 planos, cada uno de

ellos tomado a 1 μm de distancia en el eje z. La barra de escala corresponde a 10 μm . Relacionada con Película 2.

Este comportamiento se observó no sólo en las GSCs, sino también en otras células germinales en división, tanto en CB como en cistos de dos, cuatro y ocho células (Película 3).

Debido a que los espectrosomas mitóticos mantienen el marcaje anti-Hts en muestra fijada (Fig. 11), como se ha descrito también para la expresión de α -spectrin (de Cuevas & Spradling, 1998; Deng & Lin, 1997a; Lin & Spradling, 1995), la pérdida de GFP::Par-1 del espectrosoma en GSCs en división corresponde probablemente a una particularidad de esta kinasa, y no a un desensamblaje del espectrosoma durante mitosis.

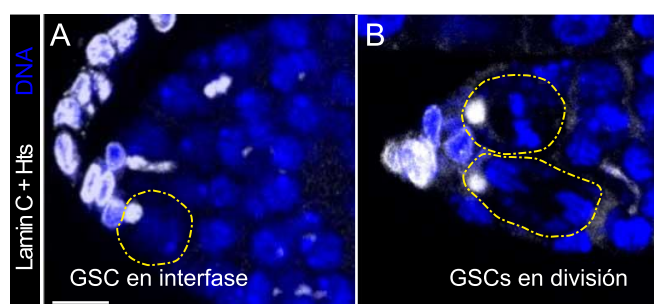


Figura 11. El espectrosoma “round” se mantiene durante la mitosis de la GSC. Tinción inmunohistoquímica de germarios control con anticuerpos anti-Hts y anti-Lamin C para marcar espectrosomas y CpCs respectivamente (blanco), y Hoechst para marcar núcleos (azul). Las líneas amarillas discontinuas señalan GSCs con espectrosomas “round”. Estos se observan tanto en GSCs en interfase (A) como en GSCs en división (B), lo que demuestra que este orgánulo no desaparece durante mitosis. La barra de escala corresponde a 10 μm .

I.1.3. Incorporación de nuevo material en el espectrosoma en crecimiento de GSC y CB

La dinámica del ciclo del espectrosoma, observado *ex vivo*, sugería que los dos fragmentos que aparecían tras una división celular, correspondientes a la morfología “plug”, debían de experimentar un aumento de tamaño para poder dar lugar a continuación a las formas “bar”, “fusing” y “exclamation point”. Se observó en detalle, por tanto, si se producía la llegada de nuevo material tanto al espectrosoma en la posición anterior (junto a CpCs), como al situado en la conexión intercelular GSC-CB.

En todas las capturas *ex vivo* donde se observaban GSCs y CBs conectados, se detectaron hilos y vesículas con señal GFP::Par-1 que se dirigían hacia el fragmento de la zona intercelular (Fig. 12; películas 4, 5). En la GSC, el nuevo material GFP::Par-1 positivo se incorporaba como hilos elongados, que eran menos abundantes y de menor tamaño que los observados en el lado correspondiente al citoplasma del CB (Fig. 12A, película 4). El material procedente del CB comenzaba su trayectoria desde la mitad posterior de esta célula y siempre asociado a su membrana plasmática, bien en forma de hilos o bien en vesículas. Se observó también la aparición de un cúmulo de material con señal GFP::Par-1 en el polo posterior del CB, bien avanzado su ciclo celular. Tras el completo estrangulamiento del espectrosoma de la GSC en morfología “exclamation point”, el material espectrosómico del CB, ya liberado del anillo citocinético, se desplazaba hacia el cúmulo del polo posterior hasta fusionarse con él (Fig. 12B; película 5).

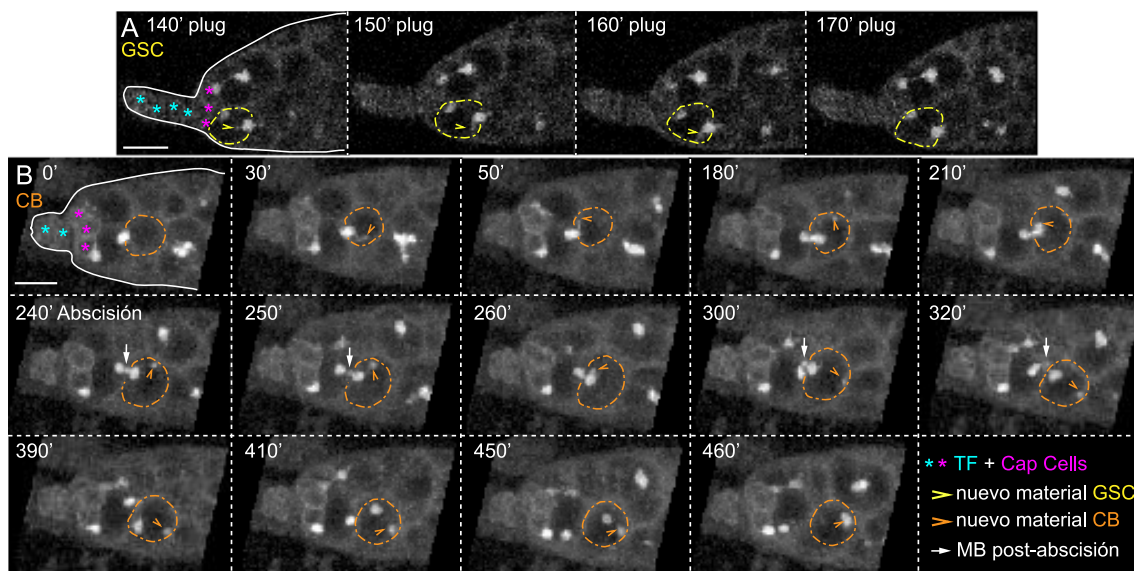


Figura 12. Adición de nuevo material durante el crecimiento del espectrosoma. Fotogramas de la grabación *ex vivo* de germarios *GFP::par-1* en los que se observa cómo nuevo material espectrosómico se transporta y se acumula en los espectrosomas de GSC (A) y de CB (B), así como la abscisión del espectrosoma y el MB resultante. Cada fotograma corresponde a una proyección máxima de 3-8 planos, cada uno de ellos tomado a 1 μm de distancia en el eje z. MB: “Midbody” del huso mitótico. Las barras de escala representan 10 μm. (A) corresponde a la Película 4 y (B) corresponde a la Película 5.

El espectrosoma “round-G2” experimentaba una menor incorporación de material en comparación con el observado durante las formas “plug”, “bar” y “fusing”. No obstante, aunque

infrecuentes, estas incorporaciones podían seguir observándose incluso durante unas horas antes de un evento de NEP (Fig. 13, Película 6).

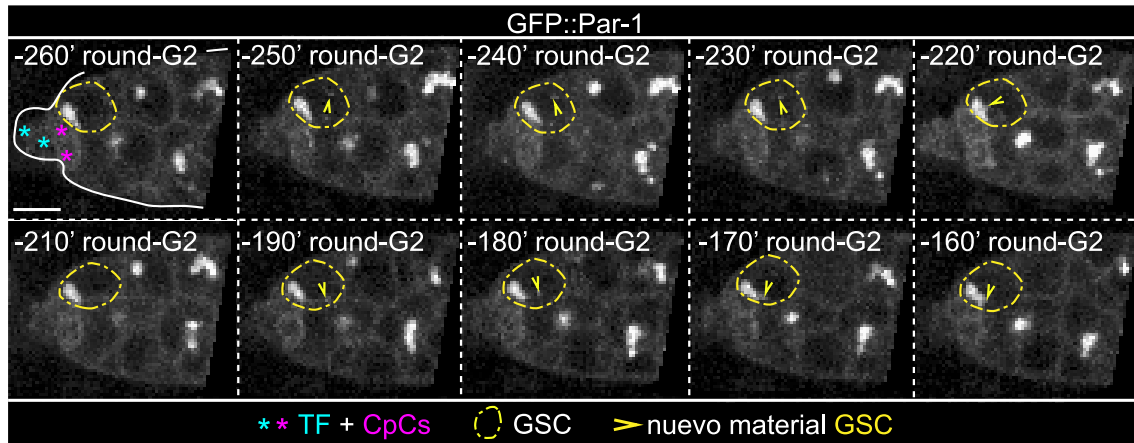


Figura 13. Incorporación de nuevo material a un espectrosoma “round-G2”. Fotogramas de la grabación *ex vivo* de un germario *GFP::par-1* en los que se muestra se incorpora nuevo material al espectrosoma “round-G2” ($t=0'$, NEP). Cada fotograma corresponde a una proyección máxima de 3-8 planos, cada uno de ellos tomado a $1\mu\text{m}$ de distancia en el eje z. La barra de escala corresponde a $10\mu\text{m}$. Relacionada con Película 6.

Para corroborar que los comportamientos observados se correspondían con un mecanismo general de crecimiento de los espectrosomas, no exclusivo de Par-1, se analizó también la distribución de Hts en GSCs y CBs en muestra fijada. En estas células, se identificaron acumulaciones de estructuras con señal Hts consistentes con la adición de nuevo material en los espectrosomas, de manera similar a lo observado con Par-1 (Fig.14).

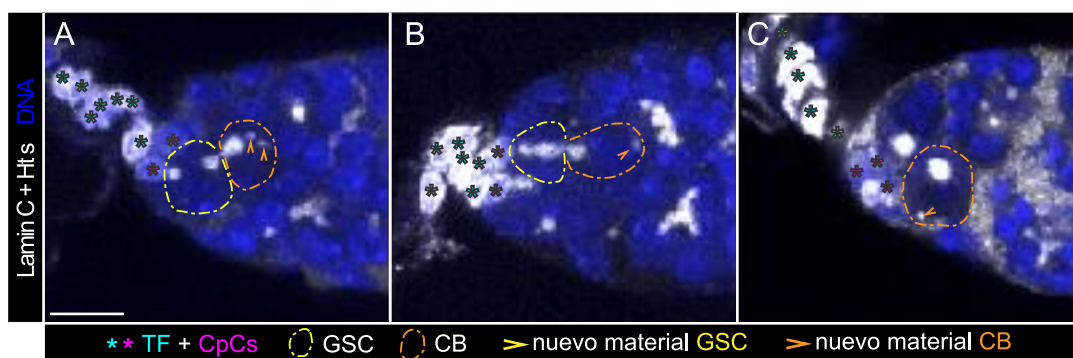


Figura 14. GSCs y CBs fijados también contienen vesículas de material espectrosómico. Tinción inmunohistoquímica de germarios control con anticuerpos anti-Hts y anti-Lamin C para marcar

espectrosomas y CpCs respectivamente (blanco), y Hoechst para marcar núcleos (cian). Se observan tanto GSCs (A,B) como CBs (A,B,C) con pequeños cuerpos positivos para Hts en su interior, que se asemejan a los capturados durante la grabación *ex vivo*. La barra de escala corresponde a 10 μm .

En conjunto, estos resultados mostraban que, en efecto, se producía la incorporación de nuevo material, compuesto no sólo de Par-1 sino probablemente también de otras proteínas como Hts, y que éste nuevo material se añadía principalmente al existente en la conexión intercelular GSC-CB, desde ambas células, sobre todo durante las formas “plug”, “bar y “exclamation point”. Además, se observó que el espectrosoma del CB maduro resultaba de la fusión entre el material asociado al surco citocinético y el acumulado en el polo posterior.

I.1.4. El midbody post-abscisión se fusiona con el espectrosoma “round-G2”

Durante su progresiva diferenciación, los CBs y los cistos de la línea germinal bloquean la citocinesis tras la división. Por el contrario, las GSCs realizan una citocinesis completa en fase G2 (de Cuevas & Spradling, 1998; Matias et al., 2015). La citocinesis implica la especificación del plano de separación y la disposición del anillo contráctil de acto-miosina, que envuelve a una estructura de proteínas, rica en microtúbulos, llamada midbody (MB). El último paso de la citocinesis es la abscisión, en la cual las membranas plasmáticas de las células hermanas se escinden físicamente y se genera el MB post-abscisión. En el caso de la línea germinal de *Drosophila*, se ha descrito que las GSCs del macho no heredan el MB post-abscisión, a diferencia de las GSCs de la hembra (Matias et al., 2015; Salzman et al., 2014).

En este trabajo de tesis se realizó un seguimiento del comportamiento del MB post-abscisión en las películas de larga duración de germarios *GFP::par-1*. La formación del MB post-abscisión se podía distinguir con la proteína de fusión *GFP::Par-1*, ya que el anillo contráctil estrangulaba el espectrosoma “fusing” que se encontraba atravesando el anillo de citocinesis, fenómeno que daba lugar a la morfología “exclamation point” (Fig. 7). Una vez completada la abscisión entre GSC y CB, el recién formado MB post-abscisión permanecía asociado a la membrana plasmática de la GSC, desplazándose durante varias horas hasta que finalmente se fusionaba con el espectrosoma “round-G2” (Fig. 15, película 7). Este comportamiento se observó en las siete películas en las que se pudo seguir el MB post-abscisión, desde su generación en la escisión de GSC y CB hasta la fusión con el espectrosoma de la GSC. Este resultado confirma, nuevamente con observación directa *ex vivo*, lo descrito

previamente en la literatura y plantea un posible papel del MB post-abscisión en la biología de la GSC de la hembra. Así, el MB post-abscisión podría actuar como plataforma de señalización para regular polaridad o potencial celular de las GSCs (Peterman & Prekeris, 2019).

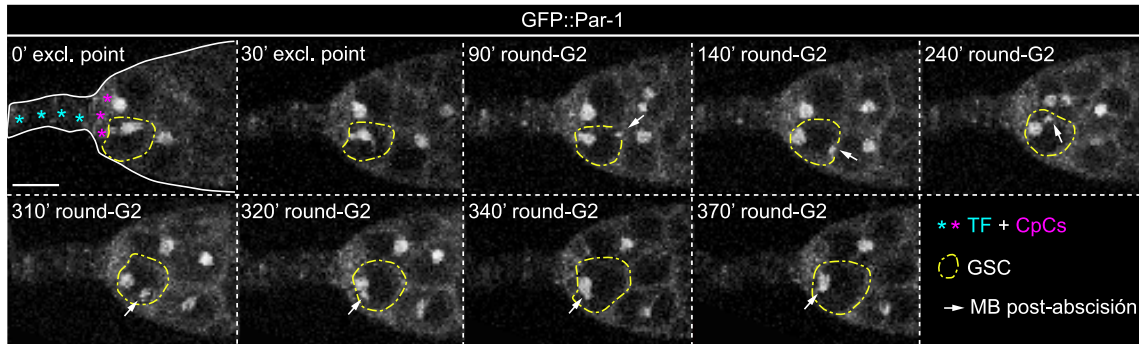


Figura 15. La GSC hereda el MB post-abscisión. Fotogramas de la grabación *ex vivo* de un germario *GFP::par-1*, en los que se muestra cómo el MB post-abscisión permanece en la GSC tras la citocinesis y se acaba fusionando con el espectrosoma “round-G2”. Cada fotograma corresponde a una proyección máxima de 3-8 planos, cada uno de ellos tomado a 1 μm de distancia en el eje z. La barra de escala corresponde a 10 μm . Relacionada con Película 7.

I.1.5. Excepciones a las observaciones previas: espectrosomas posteriores en la GSC

De las 23 GSCs que realizaron mitosis durante la captura de películas para el seguimiento de la dinámica del espectrosoma, 11 fueron grabadas el tiempo suficiente para poder seguir el comportamiento del espectrosoma durante varias horas tras la mitosis. En cuatro ocasiones, el espectrosoma, posicionado inicialmente junto a las CpCs, se desligaba de estas células y se desplazaba hacia el polo posterior de la GSC, dejando un pequeño cuerpo de material espectrosómico anterior, o cicatriz, en el polo anterior (Fig. 16A, Película 8). Esta cicatriz parecía actuar como referencia para la adición de nuevo material, ya que su tamaño crecía a medida que progresaba el ciclo. Los espectrosomas desanclados o “anchorless” (López-Onieva et al., 2008) permanecían en el polo posterior hasta que la citocinesis se completaba, momento en el que se reposicionaban hacia el polo anterior, fusionándose con el espectrosoma que había permanecido junto a las CpCs (Fig. 16B,C, Película 9).

Este resultado muestra que una proporción considerable de las GSCs posee un espectrosoma posterior durante una parte de su ciclo, aunque desconocemos cuál puede ser la

implicación de este posicionamiento alternativo del espectrosoma en el comportamiento de la GSC.

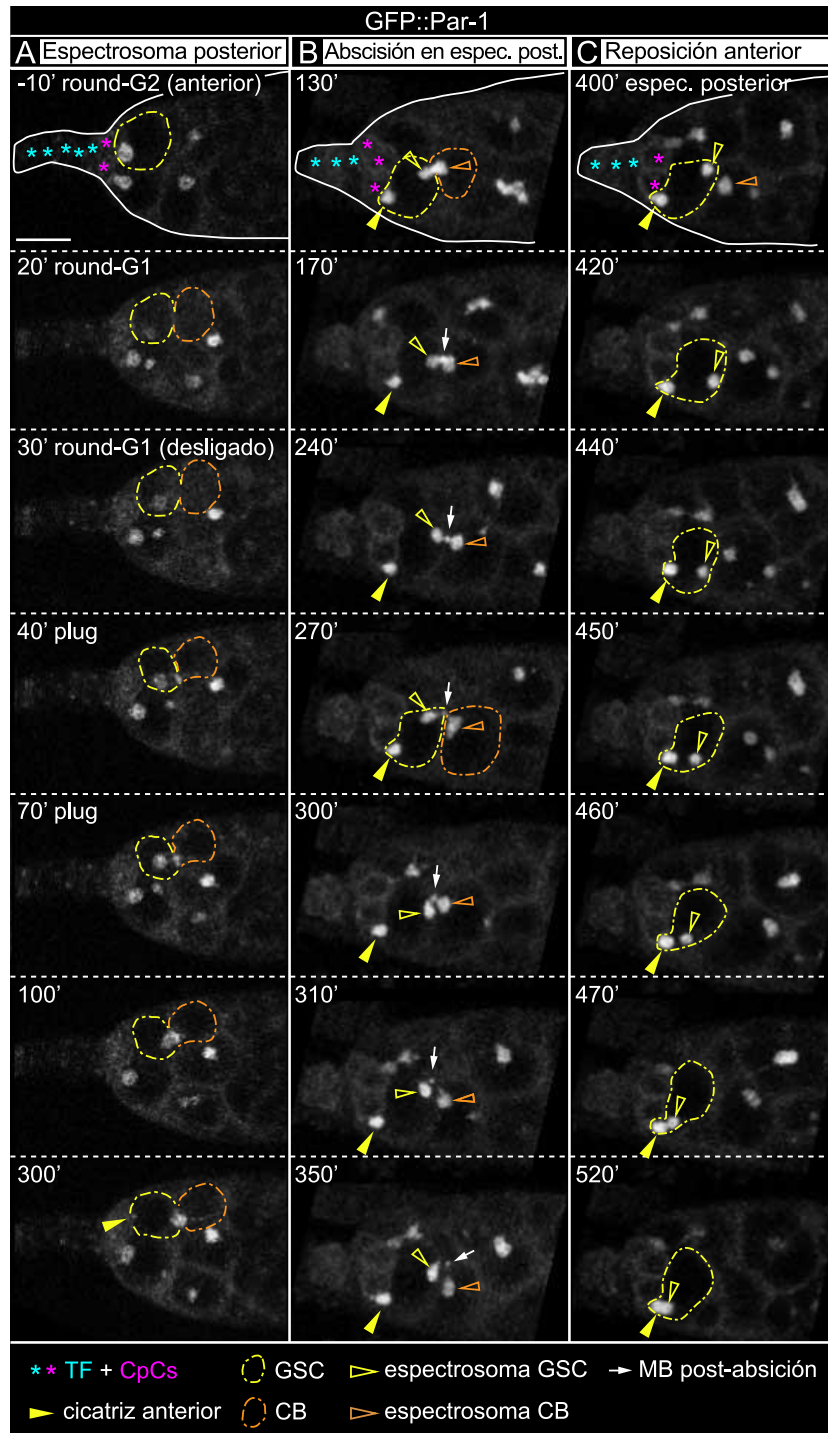


Figura 16. Espectrosomas posteriores en las GSCs. Fotogramas de la grabación *ex vivo* de germarios *GFP::par-1* en los que se muestran comportamientos inusuales del espectrosoma de las GSCs. (A) Tras la división, el espectrosoma de esta GSC no permanece junto a CpCs y se desplaza al polo posterior de la célula. Se indica la cicatriz de material espectrosómico que aparece en la parte anterior de la GSC. Relacionado con Película 8. (B,C) Esta GSC, que posee una cicatriz anterior y un espectrosoma

posterior, sufre citocinesis (B, t=130-350') y a continuación el espectrosoma se desliza hacia el margen anterior, fusionándose con el componente anterior del espectrosoma (C, t=400-520'). Cada fotograma corresponde a una proyección máxima de 3-8 planos, cada uno de ellos tomado a 1µm de distancia en el eje z. La barra de escala corresponde a 10 µm. Relacionado con Película 9.

I.1.6. Cuantificación del ciclo celular de las GSCs utilizando Fly-FUCCI y la morfología del espectrosoma

Estudios previos han utilizado marcadores específicos de fase celular que muestran que, en las GSCs, las fases G1, S y M son cortas, mientras que la fase G2 es la de mayor duración (Ables & Drummond-Barbosa, 2013; Hinnant et al., 2017; Hsu et al., 2008; Kao et al., 2015). Para caracterizar la dinámica de la progresión del ciclo celular en las GSCs de la hembra, en este trabajo se utilizó la herramienta Fly-FUCCI (*fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator*), basada en degrones de las proteínas E2F1 y Ciclina B (CycB), fusionados a GFP y RFP respectivamente, para marcar fase G1 (expresión única de GFP::E2F1), fase S (expresión única de RFP::CycB) y fase G2/M (inicialmente, expresión conjunta de GFP::E2F1 y RFP::CycB y, finalmente, solo E2F1) (Zielke et al., 2014) (Fig. 17).

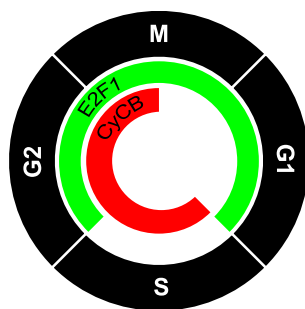


Figura 17. Herramienta Fly-FUCCI. Esquema del funcionamiento del sistema Fly-FUCCI. En el inicio de mitosis se expresan ambos marcadores, GFP::E2F1 y RFP::CycB. Hacia mitad de mitosis, RFP::CycB es degradado y permanece sólo la expresión verde de GFP::E2F1. En la transición entre fase G1 y S, GFP::E2F1 es degradado y RFP::CycB comienza a acumularse de nuevo (color rojo). Al comenzar la fase G2, reaparece la expresión de GFP::E2F1 y, en combinación con RFP::CycB, vuelven a mostrarse los colores verde y rojo (adaptado de Zielke et al., 2014).

Se utilizó una versión de esta herramienta en la que los marcadores GFP::E2F1 y RFP::CycB se localizaban exclusivamente en el núcleo y, además, su expresión estaba

supeditada a la del promotor *nanos-Gal4*, lo que permitía visualizar los marcadores únicamente en las células de la línea germinal (Fig. 18A). Se realizaron películas de larga duración (hasta 16 horas), capturando imágenes cada 10 minutos para minimizar el fotoblanqueamiento de los marcadores y el sufrimiento de la muestra. A pesar de la extensa duración de las películas, no fue posible capturar una misma GSC realizando dos mitosis consecutivas, por lo que no se pudo obtener una estimación directa de la duración de un ciclo celular completo en nuestras condiciones experimentales. Se observaron GSCs *ex vivo* que expresaban sólo GFP::E2F1 (células verdes, en G1), sólo RFP::CycB (rojas, en S) o bien ambos marcadores (amarillas, en G2/M) (Fig. 18B). Las GSCs que realizaban mitosis se podían distinguir ya que los marcadores nucleares GFP y RFP eran liberados desde el núcleo hacia el citoplasma, presumiblemente en el momento de NEP ($t=0'$ en Fig.18B; Película 10), fenómeno seguido de la separación de las dos células hijas resultantes y de la pérdida de la señal RFP ($t=20'$). Además de las células verdes, rojas y amarillas, también se observaron células que no expresaban GFP ni RFP, y que se clasificaron como GSCs negras. El análisis de seis GSCs que realizaron mitosis durante la captura de imágenes permitió la cuantificación completa de las fases M, G1 y S, y de una fracción de fase G2. En estas GSCs, la transición de marcadores ocurría de la siguiente manera: expresión de GFP y RFP (G2/M) seguida de expresión de sólo GFP (G1), desaparición de marcadores (negro), expresión de sólo RFP y finalmente expresión gradual de GFP y RFP de nuevo (G2, Fig. 18B; Película 10). Este resultado se correspondía con los cambios de color predichos por la herramienta y permitió determinar que las GSCs negras son células en fase G1 o S.

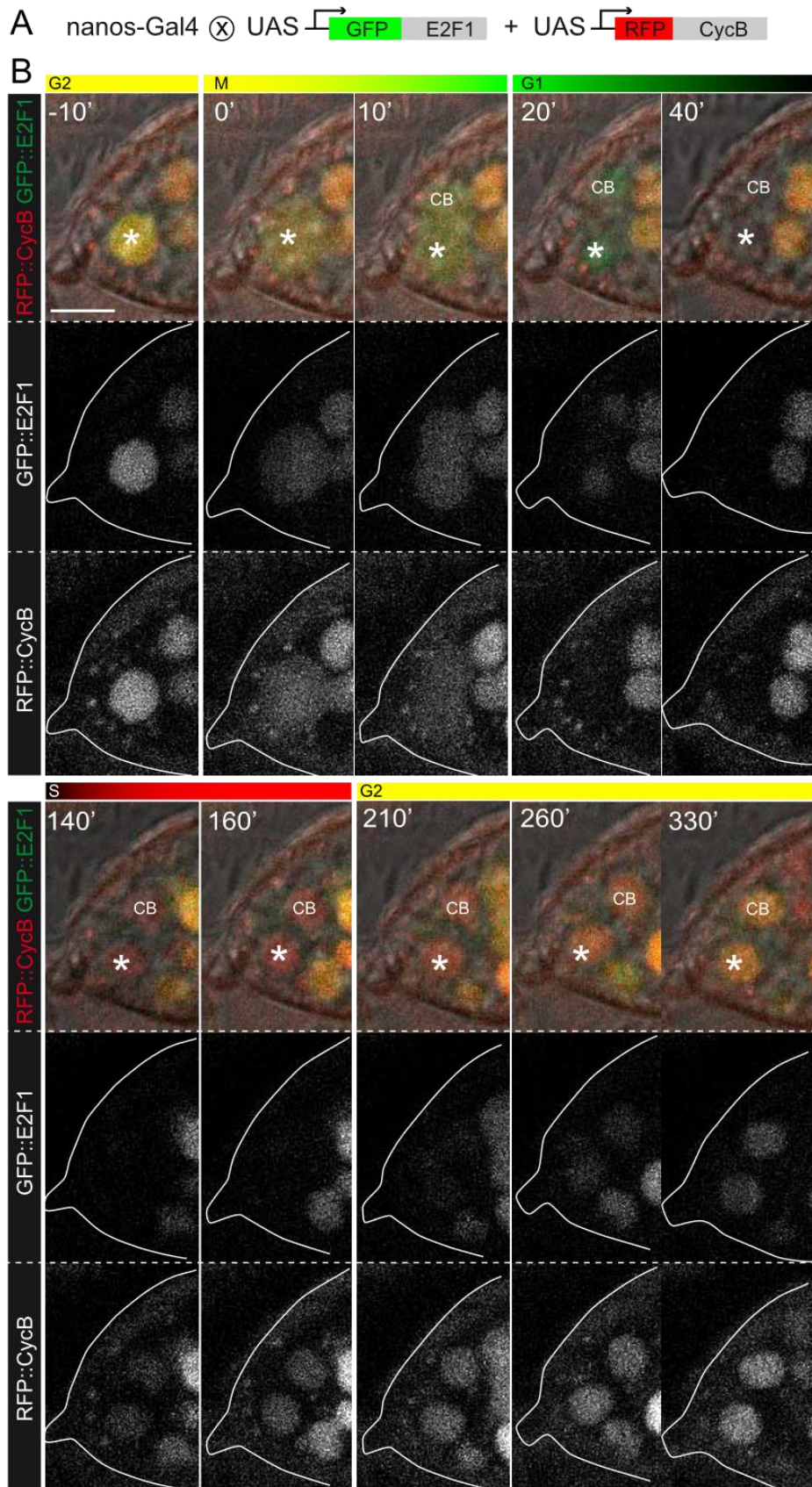


Figura 18. Expresión *ex vivo* de marcadores Fly-FUCCI en GSCs. (A) Esquema del sistema GAL4-UAS utilizado para expresar los marcadores Fly-FUCCI en la línea germinal de la hembra. (B)

Fotogramas de la grabación *ex vivo* de germarios *nanos>GFP::E2F1+mRFP1::NLS-CycB* en los que se muestra la variación de la expresión de las señales GFP y RFP en la división de una GSC. Tanto GFP::E2F1 (verde) como RFP::CycB (rojo) están presentes en G2 ($t=-10'$) y al inicio de M ($t=0'$). GFP::E2F1 permanece solo en G1 temprana ($t=20'$), mientras que en el resto de la fase G1 desaparece ($t=40'$) y no se aprecia señal GFP o RFP. En fase S, RFP::CycB reaparece ($t=140'$). Finalmente, tanto GFP::E2F1 como RFP::CycB son de nuevo visibles en G2 ($t=210'$). Cada fotograma corresponde a una proyección máxima de 3-8 planos, cada uno de ellos tomado a $1\mu\text{m}$ de distancia en el eje z. Los asteriscos señalan la GSC. La barra de escala corresponde a $10\mu\text{m}$. Relacionado con Película 10.

En cuanto a la duración de las fases según la presencia de colores observados, la fase M tenía una duración media de 20 minutos y las fases G1+S correspondían a $240\text{ minutos}\pm 17.32$ (Fig. 19, $n=6$). Considerando la estimación previa por la que, en nuestras condiciones de cultivo, un ciclo duraba aproximadamente 15 horas (Fig. 8), la fase M correspondería a un 3.3% del ciclo total, G1+S a un 26.7% y G2 al restante 70%, esto es, en torno a 10.5 horas.

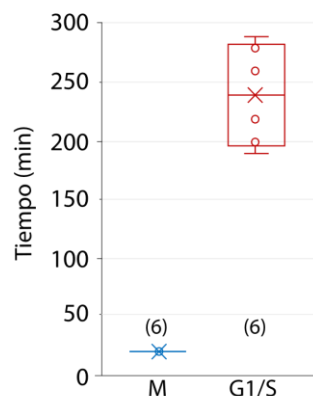


Figura 19. Cuantificación de la duración de M y G1+S. Se muestran los valores obtenidos, la media (cruces) y la mediana (línea horizontal que cruza las cajas). La n se indica entre paréntesis.

Una vez comprobado el comportamiento de la herramienta Fly-FUCCI, se estudió la expresión de estos marcadores de ciclo celular junto con las diferentes morfologías del espectrosoma en GSCs fijadas. Se analizó la expresión de los reporteros Fly-FUCCI en 105 GSCs procedentes de 37 germarios teñidos con anticuerpos anti-Lamin C y anti-Hts para marcar, respectivamente, CpCs (concretamente, su membrana nuclear) y los espectrosomas y fusomas, junto con Hoechst para marcar núcleos (Fig. 20).

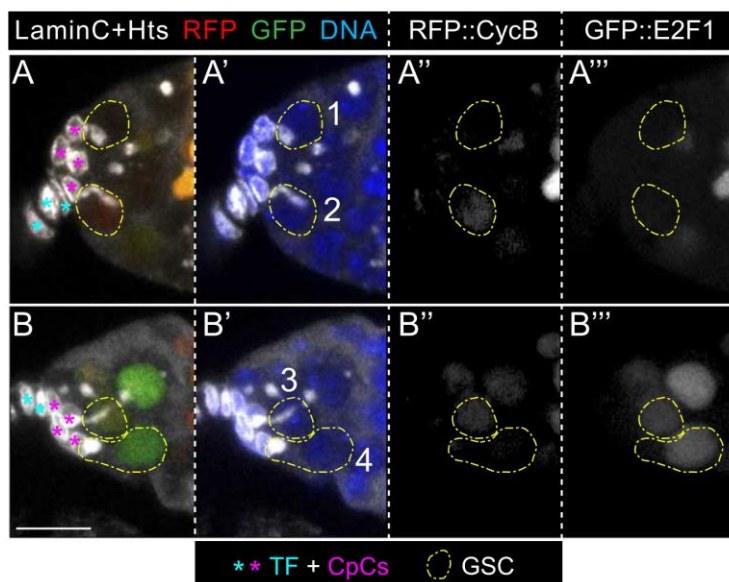


Figura 20. Correspondencia entre marcadores Fly-FUCCI y espectrosomas en GSCs fijadas.

Tinción inmunohistoquímica de germarios *nanos>GFP::E2F1+mRFP1::NLS-CycB* con anticuerpos anti-Hts y anti-Lamin C para marcar espectrosomas y CpCs respectivamente (blanco), y Hoechst para marcar núcleos (azul). Las señales de GFP::E2F1 (verde) y RFP::CycB (rojo) corresponden a la fluorescencia endógena de los degrones y no están amplificadas mediante tinción inmunohistoquímica. **(A)** (1) GSC negra con espectrosoma “round”, considerada en fase G1; (2) GSC positiva para RFP con espectrosoma “fusing” (fase S) **(B)** (3) GSC positiva para GFP y RFP con espectrosoma “exclamation point” (fase G2); (4) GSC positiva para GFP con espectrosoma “round” (fase G1). La barra de escala corresponde a 10 μ m.

De las GSCs analizadas, el 70.5% expresaban GFP y RFP (G2/M; 74 células), el 10.5% sólo GFP (G1; 11 células) y el 3.7% sólo RFP (S; cuatro células). El 15.2% restante (16 células) no poseía una intensidad de fluorescencia verde o roja suficiente y se clasificaron, al igual que en los análisis *ex vivo*, como GSCs negras. Las células GFP positivas (G1) tenían espectrosomas “round”, “plug” y “bar”; las RFP positivas (S) tenían todas espectrosoma “fusing”; y las GFP+RFP positivas (G2) tenían “fusing”, “exclamation point” y “round”. Estas observaciones estaban en concordancia con descripciones previas (Ables & Drummond-Barbosa, 2013; Hinnant et al., 2017; Hsu et al., 2008; Kao et al., 2015). Para poder clasificar las GSCs negras con mayor precisión en las fases del ciclo celular, se analizó la morfología del espectrosoma de las 16 GSCs negras observadas: cinco mostraban espectrosomas “round”, dos tenían “plug”, cinco “bar” y cuatro “fusing”. Al igual que con los análisis *ex vivo* de Fly-FUCCI, los espectrosomas observados en GSCs negras fijadas también confirmaban que estas células se encuentran en fase G1/S. Específicamente, considerando que ninguna de las células GFP

positivas tenían espectrosomas “fusing”, y que todos los espectrosomas en células RFP positivas eran “fusing”, se clasificaron las GSCs negras con espectrosomas “round”, “plug” o “bar” como correspondientes a fase G1, y las cuatro GSCs restante con espectrosomas “fusing” como pertenecientes a fase S. Por tanto, de la muestra de 105 GSCs fijadas, 21.9% se encontraban en fase G1 (GFP positivas o negras, con espectrosomas “round”, “plug” y “bar”), 7.6% en fase S (negras o RFP positivas, con espectrosomas “fusing”) y 70.5% en G2/M (GFP+RFP positivas con espectrosomas “fusing”, “exclamation point” or “round”; Fig.21A,B).

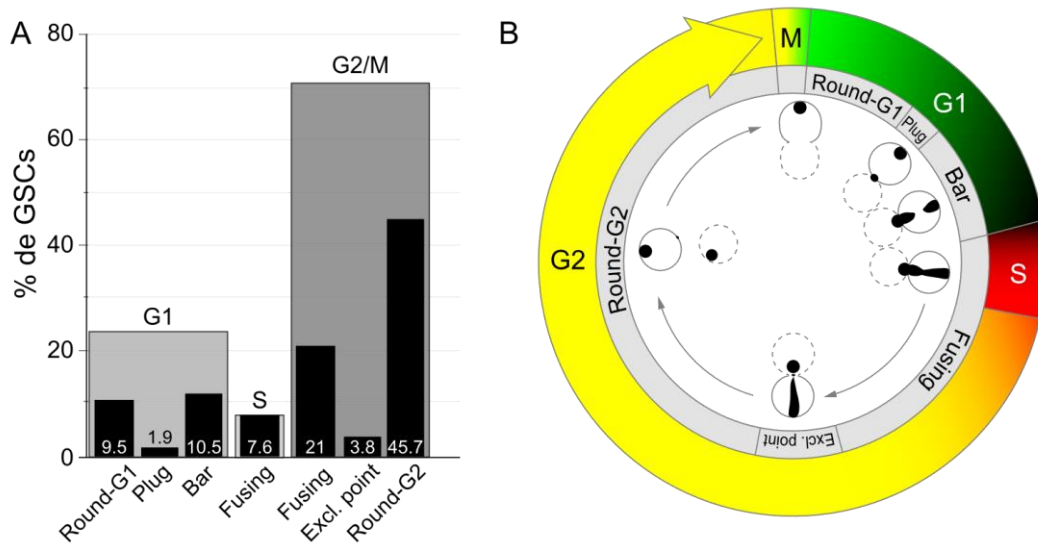


Figura 21. Distribución de las fases celulares según marcadores Fly-FUCCI y espectrosomas en GSCs fijadas. (A) Porcentajes de GSCs en G1, S o G2/M y las morfologías de espectrosomas asociadas a cada fase del ciclo celular. Los valores mostrados en las barras opacas corresponden al porcentaje de GSCs que poseen espectrosomas con una determinada morfología (n=105). **(B)** Representación esquemática de las dinámicas del espectrosoma y de los reporteros Fly-FUCCI a lo largo del ciclo celular de GSCs, incluyendo las observaciones de muestra viva y fijada. Las líneas discontinuas representan CBs.

I.1.7. Eventos durante la división de las GSCs

Para caracterizar con mayor detalle la mitosis en las GSCs, se realizaron películas de germarios *ex vivo*, durante 2 horas, capturando imágenes cada 1.5 minutos. Los germarios utilizados en este caso expresaban de forma ubicua YFP::Asterless (YFP::Asl) para distinguir centrosomas, GFP:: α Tubulin (GFP:: α Tub) para marcar microtúbulos y por último Histone 2AV::mRFP (His::RFP) para visualizar la cromatina. Se capturaron 14 GSCs que realizaron mitosis durante

la grabación y cuya observación permitió identificar tres eventos de referencia en la división de GSCs: 1) la orientación de los centrosomas, 2) la translocación del centrosoma anterior (el que se posiciona más próximo a CpCs) y 3) la separación de centrosomas tras mitosis (Fig. 22A).

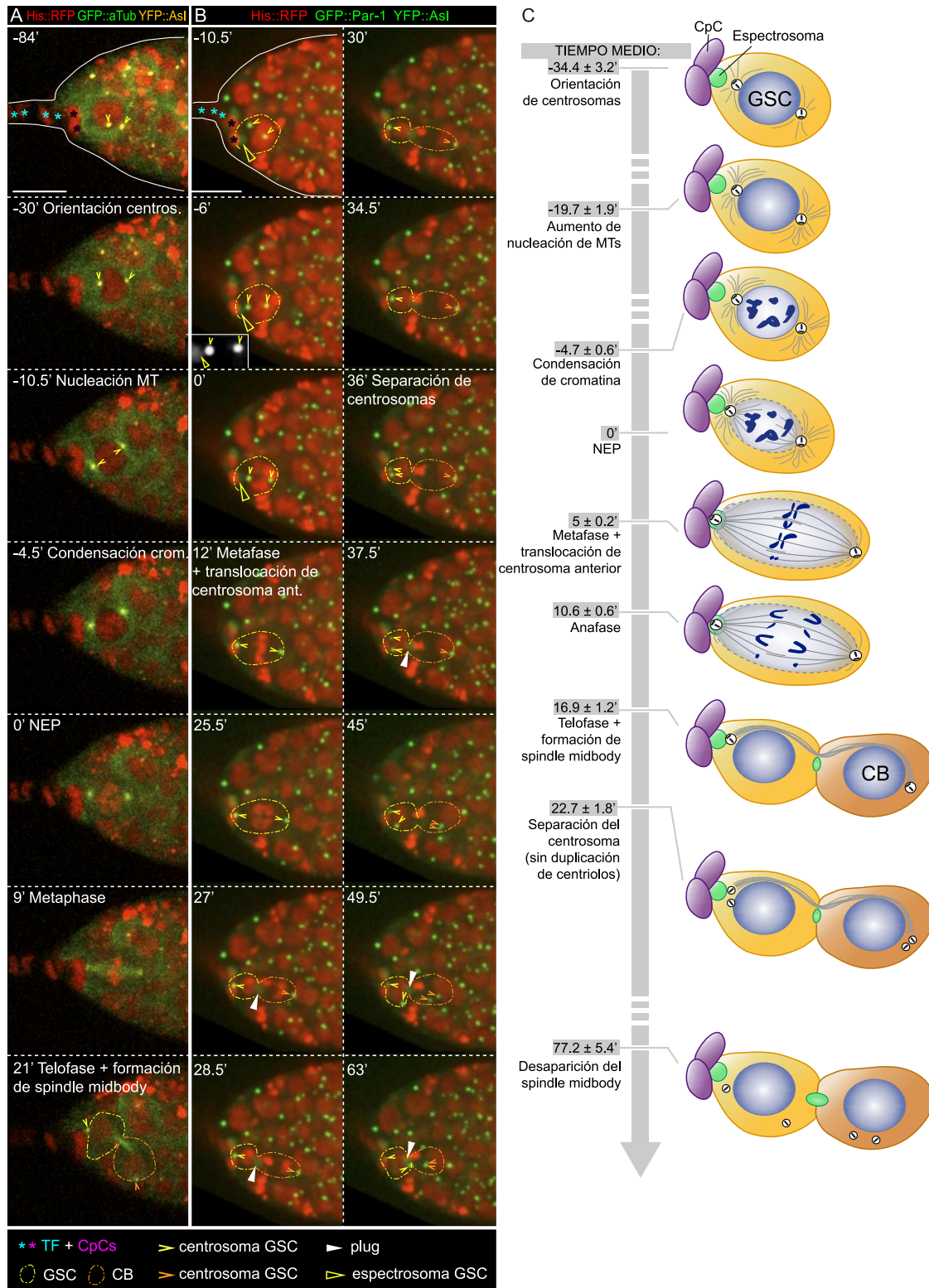


Figura 22. Comportamiento de centrosomas y espectrosoma en la división de GSCs. (A) Fotogramas de la grabación *ex vivo* de germarios *YFP::asl*, *GFP::atub*, *his::RFP* que muestran el

comportamiento de centrosomas, microtúbulos y cromatina, respectivamente, durante un evento de división de una GSC (NEP, $t=0'$). Cada fotograma corresponde a una proyección máxima de 3–8 planos, cada uno de ellos tomado a $1\mu\text{m}$ de distancia en el eje z. Relacionado con Película 11 **(B)** Fotogramas de la grabación *ex vivo* de germarios *YFP::asl*, *his::RFP*, *GFP::par-1* en los que se muestra el comportamiento de centrosomas, cromatina y espectrosomas, respectivamente (películas hechas por la Dra. María Lobo Pecellín). Se observa la asociación del centrosoma anterior al espectrosoma ($t=-6'$), su posterior translocación al córtex celular ($t=12'$) y la separación del centrosoma tras la división ($t=36'$). Detalle en panel $t=-6'$: zoom del canal correspondiente a las señales del espectrosoma (*GFP::Par1*) y los centrosomas (*YFP::Asl*) de la GSC. Relacionado con Película 12. **(C)** Esquema que resume los eventos observados durante la división de GSCs en el que se representan centrosomas (blanco), centriolos (negro), microtúbulos (gris), CpCs (morado), espectrosoma (verde) y cromatina (azul oscuro). Se muestran los valores medios de tiempo en el que se inicia cada evento con respecto a NEP ($t=0'$) junto con el error estándar de la media. La n de cada evento se especifica en la Figura G2. La barra de escala corresponde a $10\mu\text{m}$.

Antes de la mitosis, los centrosomas mostraron un comportamiento dinámico (analizado en detalle más adelante) hasta posicionarse, enfrentados, en polos opuestos del diámetro nuclear, a los -34.4 ± 3.2 minutos. Una vez orientados, los centrosomas aumentaban la nucleación de microtúbulos, visualizándose una señal *GFP:: αtub* más intensa ($-19.7\pm 1.9'$). A continuación, comenzaba la condensación de cromatina ($-4.7\pm 0.6'$), seguida de NEP ($t=0'$), formación del huso mitótico, metafase ($5\pm 0.2'$), anafase ($10.6\pm 0.6'$) y telofase ($16.9\pm 1.2'$), evento éste último que también marcaba la formación del “spindle MB” como un conjunto denso de microtúbulos que se extendía a través del anillo citocinético, conectando las dos células hijas. El “spindle MB” desaparecía aproximadamente 1 hora después ($77.2\pm 5.4'$; Fig. 22, 23; Película 11).

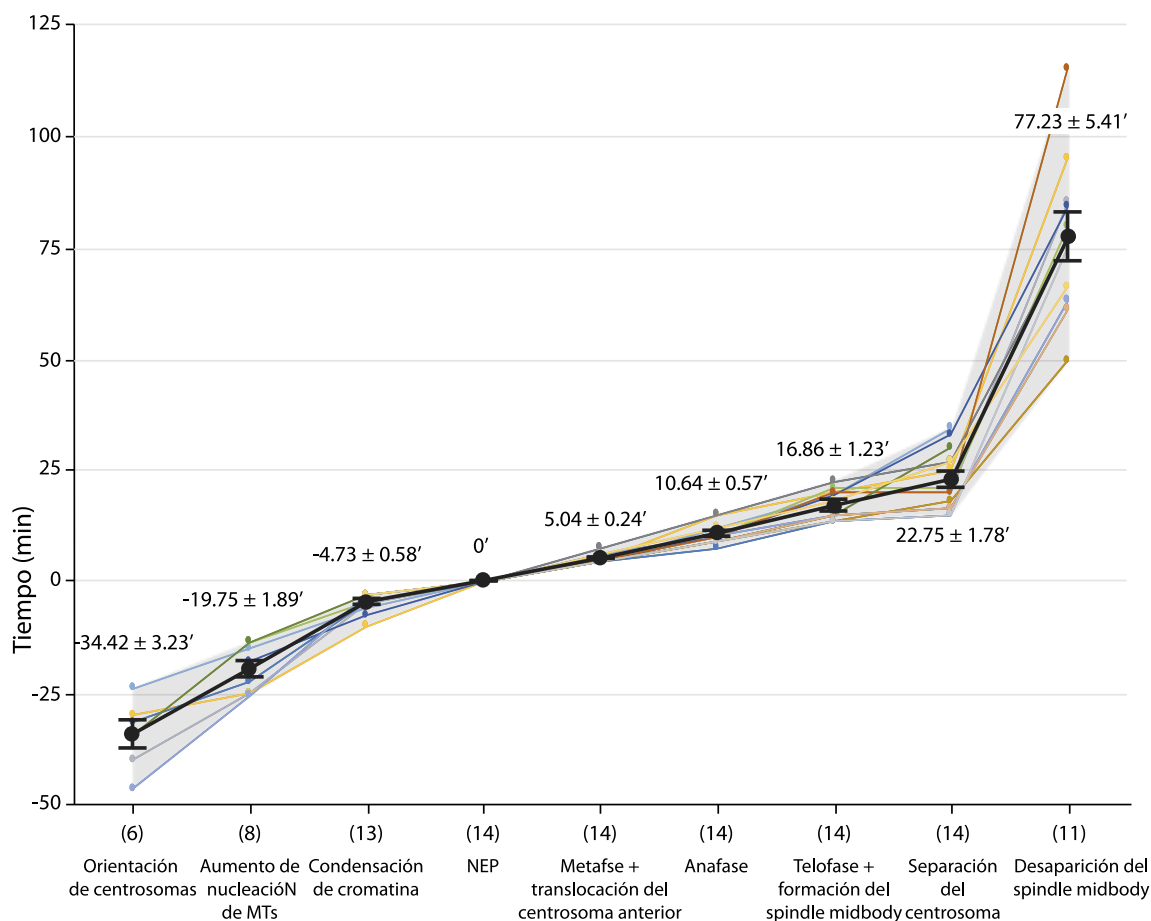


Figura 23. Progresión temporal de los eventos celulares observados durante la mitosis de GSCs. Cuantificación del inicio de los nueve eventos observados durante la grabación *ex vivo* de la división de 14 GSCs, respecto de NEP ($t=0'$). No todos los eventos fueron capturados en cada una de las 14 GSCs observadas; el número de GSCs analizadas para cada evento se especifica entre paréntesis (n). Se muestra la media y el error estándar de la media para el tiempo de comienzo de cada evento (negro), así como los datos correspondientes a cada GSC individual (resto de colores, un color por GSC). Datos correspondientes con el esquema de la Figura 22C.

Durante la división de la GSC, el huso mitótico se orienta de forma que uno de sus extremos mira hacia las CpCs, un proceso que requiere un espectrosoma funcional (Yamashita, 2018). En trabajos previos del grupo del Dr. Acaimo González Reyes, la Dra. María Lobo Pecellín, durante su estancia en el laboratorio del Dr. Jordan Raff, realizó películas de germarios que expresaban GFP::Par-1, YFP::Asl y His::RFP para definir en detalle la interacción del centrosoma anterior con el espectrosoma “round” mitótico. En estas películas, se observó que

el centrosoma anterior estaba adyacente al espectrosoma al comienzo la mitosis, definido por la condensación de cromatina ($n=4$; Fig. 23B, $t=-6'$). Esta asociación del centrosoma anterior con el espectrosoma, inamovible al comienzo de metafase, parecía determinar el alineamiento final de ambos centrosomas con respecto al eje anteroposterior del germario. Este resultado concuerda con trabajos anteriores que muestran que uno de los centrosomas de la GSC se asocia con el espectrosoma en mitosis, pero no durante interfase (Deng & Lin, 1997b; Salzman et al., 2014; Stevens et al., 2007), contradiciendo las descripciones de Lu et al., 2012 de que la gran mayoría de GSCs poseen un centrosoma asociado a la interfase GSC/CpC. También se observó que, una vez el centrosoma se posicionaba junto al espectrosoma, éste realizaba una translocación hacia el cortex celular adyacente al espectrosoma durante metafase (Fig. 22A, $t=9'$; 22B, $t=12'$). Esta zona parecía ser el punto de anclaje definitiva del centrosoma, ya que permanecía ahí durante el resto de la mitosis.

El último evento de referencia que caracteriza la división de una GSC es la separación de los centrosomas después de mitosis. En todos los casos analizados, tanto las grabaciones pertenecientes a este trabajo de tesis como en las grabaciones de la Dra. María Lobo Pecellín, esto ocurría solo unos minutos tras telofase, en torno a los 22.7 ± 1.8 minutos (Fig. 22B,C; Película 12). Por tanto, la mayoría de las GSCs presentes en un mismo nicho deberían de poseer dos centrosomas a lo largo de gran parte de su ciclo. De forma destacable, el centrosoma del CB se separaba casi a la vez que el de la GSC, apoyando la hipótesis propuesta en trabajos anteriores sobre una sincronización del ciclo celular del par GSC/CB, al menos hasta fase S (de Cuevas & Spradling, 1998).

I.1.8. La separación del centrosoma en G1 ocurre sin duplicación de centriolos

En el momento de iniciar la mitosis, una célula animal posee dos centrosomas activos. De esta manera, cada célula hija resultante heredará un centrosoma compuesto por material pericentriolar, un centriolo “madre” antiguo y un centriolo “hijo” nuevo (éste último se puede visualizar con el marcador Centrobin (Cnb); Januschke et al., 2011; Zou et al., 2005). Los centriolos se duplican una única vez en cada ciclo celular, habitualmente en fase S y antes de la separación del centrosoma, de forma que, cuando los dos centrosomas hermanos se alejan uno del otro, para disponerse en lados opuestos de la célula y formar el huso mitótico, cada uno de ellos posee para entonces un par de centriolos.

Las observaciones realizadas en este trabajo de tesis acerca de la separación del centrosoma que ocurre en las GSCs en fase G1, pocos minutos después de telofase, indicaban que, en estas células, dicha separación podría estar ocurriendo antes de la duplicación de sus centriolos. Para confirmar esta hipótesis, se utilizaron las proteínas de fusión YFP::Centrobin (YFP::Cnb) y EB1::GFP, expresadas bajo el promotor ubicuo poly-Ubiquitin, que marcaban los centriolos hijos y los microtúbulos, respectivamente. Utilizando muestra viva (Fig. 24A; Película 13), las GSCs en división mostraban dos puntos de señal YFP::Cnb asociados con alta intensidad de EB1::GFP, confirmando que ambos centrosomas mitóticos poseían centriolos hijos. Durante metafase, la señal YFP::Cnb se desvanecía y aumentaba brevemente en el huso mitótico, antes de concentrarse de nuevo en los centrosomas aproximadamente 10 minutos más tarde. En la GSC post-mitótica, se observaba un único punto de señal YFP::Cnb, que se desplazaba por el citoplasma sin duplicarse durante las siguientes 1.5 horas (Fig. 24A; Película 13). Dado que en las GSCs el centrosoma se separa en dos en torno a los 23 minutos tras la división celular (nuestras observaciones), este resultado indica que el centrosoma de las GSCs se separa antes de duplicar sus centriolos.

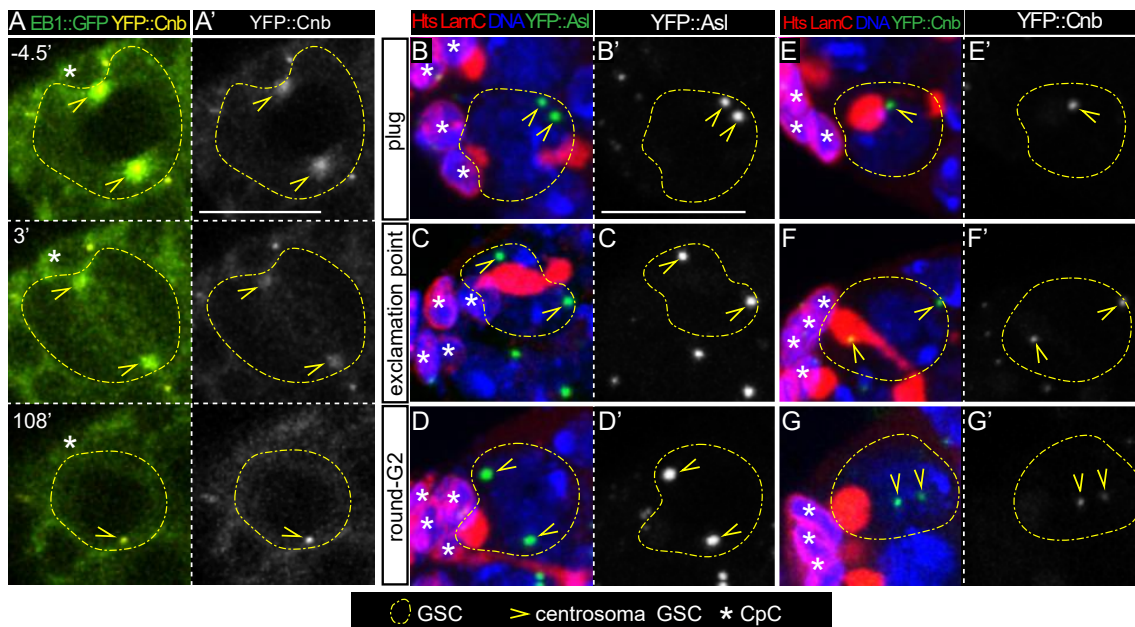


Figura 24. Los centrosomas de GSCs se separan antes de duplicar sus centriolos en fase S. (A) Fotogramas de la grabación *ex vivo* de un germario *EB1::GFP*, *YFP::cnb* que muestran cómo la célula que permanece como GSC junto a CpCs sólo posee un centrosoma positivo para YFP::Cnb a los 108 minutos tras la mitosis (NEP, $t=0'$). Relacionado con Película 13 (B-G) Tinción inmunohistoquímica de germarios *YFP::asl* (B-D) y *YFP::cnb* (E-G) con anticuerpos anti_Hts y anti-Lamin C (rojo) para marcar espectrosomas y CpCs, respectivamente, y con Hoechst para marcar núcleos (azul). En los paneles B-

D, la señal verde marca ambos centrosomas de cada célula, positivos para Asl. En los paneles E-G, la señal verde marca centrosomas positivos para Cnb, por lo que sólo las células con centriolos duplicados contienen dos centrosomas positivos para Cnb. Todas las células con espectrosomas “plug” o “bar” poseen sólo un centrosoma positivo para Cnb, mientras que “exclamation point” o “round-G2” tienen dos Cnb positivos, por lo que la duplicación debe producirse en fase S. La barra de escala corresponde a 10 μm .

Para definir en qué momento del ciclo se produce la duplicación de centriolos, a continuación se analizaron GSCs fijadas que expresaban YFP::Asl o YFP::Cnb, marcando en ambas el espectrosoma con anti-Hts; estas tinciones inmunohistoquímicas se realizaron con la ayuda de la Dra. Miriam Marín Menguiano del laboratorio del Dr. Acaimo González Reyes (Fig. 24B,G). Se observaron dos puntos de señal YFP::Asl en todas las GSCs analizadas (n=40). En cuanto a las GSC que expresaban YFP::Cnb (n=44), se identificaron nueve que poseían un solo punto de señal YFP::Cnb (dos con espectrosomas “round”, dos “plug” y cinco “bar”), mientras que las 35 restantes poseían dos puntos de señal (cinco “fusing”, tres “exclamation point” y 27 “round”). Dado que todas las GSC con “plug” o “bar” (por tanto en G1) poseían sólo un punto de señal YFP::Cnb, y que todas las GSCs “fusing” o “exclamation point” (en fase S o G2) presentaban dos puntos de señal, concluimos que la duplicación de centriolos en las GSC de la hembra ocurre después de la separación del centrosoma, probablemente en fase S temprana, como se ha descrito en células animales (Fu et al., 2015). Por tanto, las GSCs con un espectrosoma “round” y un único punto de señal YFP::Cnb se encontrarían en fase G1.

I.1.9. Los centrosomas anterior y posterior muestran dinámicas distintas en GSCs premitóticas

La orientación de los centrosomas durante la mitosis de las GSCs está documentada con claridad (Deng & Lin, 1997b; Salzmänn et al., 2014); por el contrario, la posición de los centrosomas durante interfase es más controvertida. Salzmänn et al. (2014) y Stevens et al. (2007) describieron que, durante interfase, los centrosomas no se orientaban con respecto al nicho, mientras que Lu et al. (2012) proponía que las GSCs de la hembra, al igual que las del macho, poseían siempre un centrosoma posicionado junto a la interfaz GSC/CpCs (Yamashita et al., 2003).

En este trabajo de tesis, la grabación de los movimientos de centrosomas sugería que ambos orgánulos se encontraban en cualquier posición dentro de la célula durante interfase, y que, sólo momentos antes de la mitosis, su localización era más restringida, especialmente la del centrosoma anterior, cuyo movimiento se limitaba al hemisferio anterior de la célula (Fig. 25; Película 14). Una vez que ambos centrosomas se orientaban en el eje anteroposterior, enfrentados en los extremos opuestos del diámetro del núcleo, su movimiento era limitado, pero aún mostraban variaciones en su posición (Película 14).

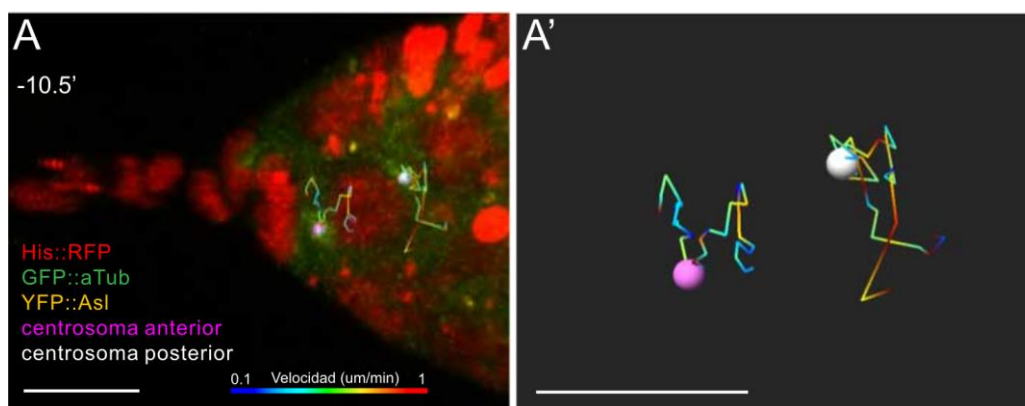
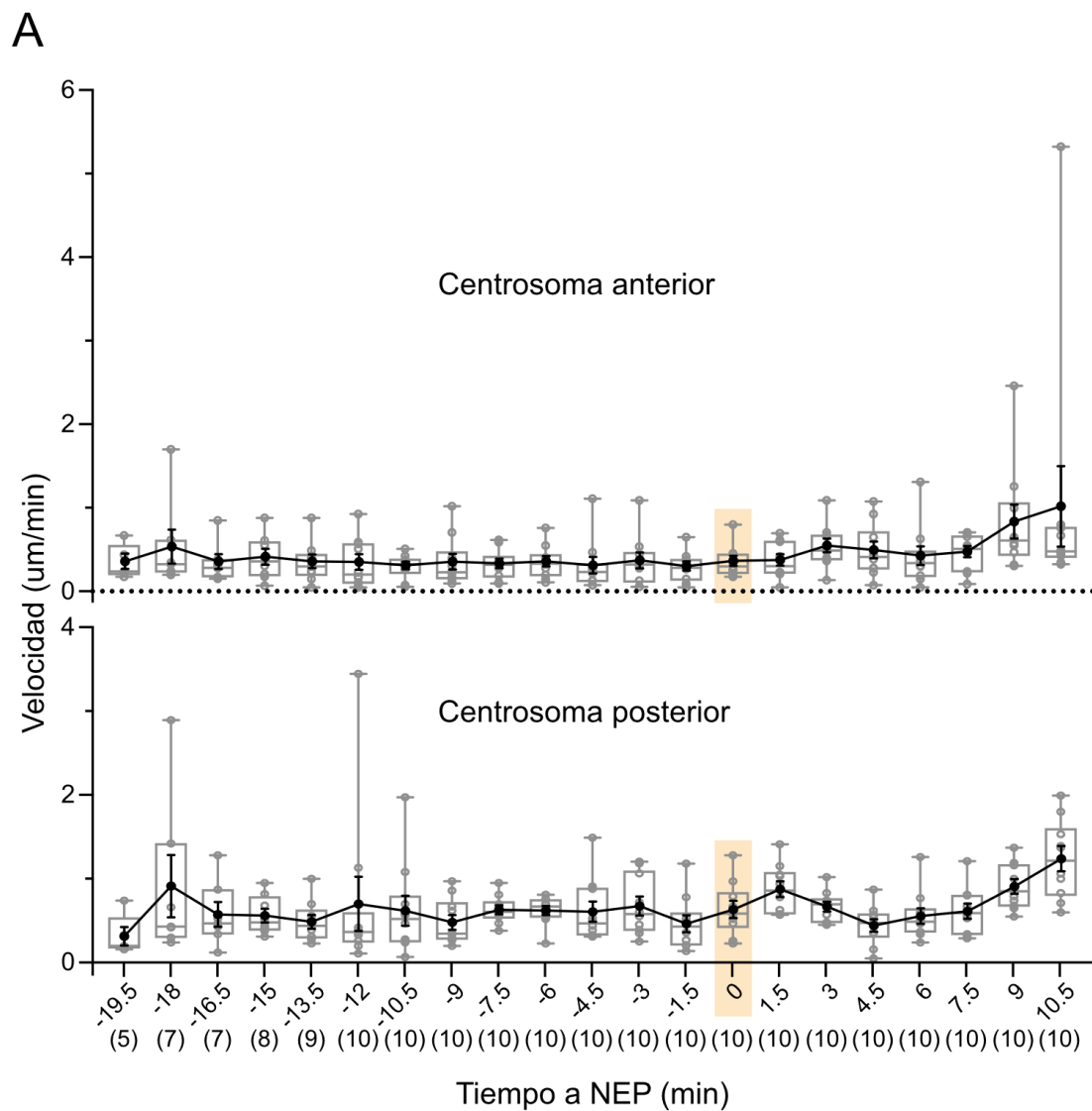


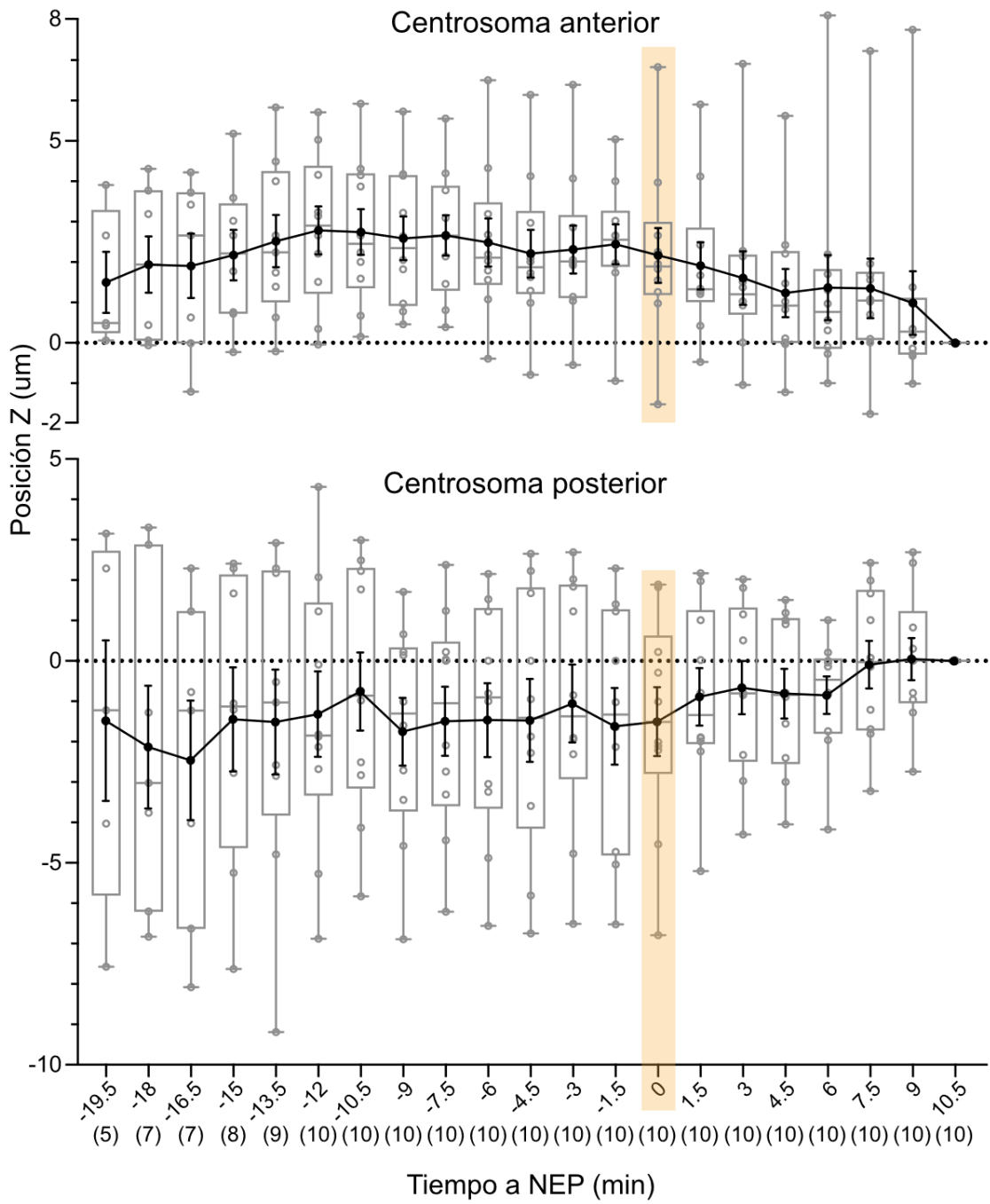
Figura 25. Rastreo de las dinámicas de los centrosomas anterior y posterior antes de la división de la GSC. (A) Reconstrucción en volumen de un germlario *YFP::asl*, *GFP::atub*, *his::RFP* en el que el movimiento de ambos centrosomas se ha rastreado durante 30 minutos. Las estelas del rastreo de ambos centrosomas poseen un código de color que refleja la velocidad de sus movimientos ($\mu\text{m}/\text{min}$). (A') Magnificación de las estelas del rastreo de centrosomas. El centrosoma anterior reduce su movimiento gradualmente hasta asociarse con el margen anterior de la célula. El centrosoma posterior se desplaza mayores distancias y a también mayor velocidad. La barra de escala corresponde a $10 \mu\text{m}$. Relacionado con Película 14.

Finalmente, se analizó en detalle la dinámica de las posiciones de los centrosomas, cuantificando la posición en el eje z y la velocidad de desplazamiento de los centrosomas anterior y posterior de 10 GSCs, desde los -20 minutos hasta los 10 minutos, momento este último en el que la placa metafásica se había formado con claridad. La posición final de cada centrosoma en la placa metafásica se consideró $z=0$ para ambos. La posición z inicial del centrosoma anterior fue considerada, en todos los casos, como valor positivo y el valor de las subsecuentes posiciones en z de ambos centrosomas, anterior y posterior, fue calculado de acuerdo con esto. Los resultados mostraron que, de media, ambos centrosomas se movían en

un rango de 3 μm con respecto a la placa metafásica final, y que el centrosoma anterior limitaba su movimiento gradualmente a la zona de la GSC en contacto con la roseta de las CpCs. Por el contrario, el centrosoma posterior se movía a mayor velocidad hasta que adoptaba su posición final (Fig. 26; Película 14). Estos resultados mostraban que los centrosomas de la GSC de la hembra son muy dinámicos, incluso cuando ya están colocados a ambos lados del núcleo antes de la división, y que el centrosoma anterior sólo fija su posición una vez que se asocia con el espectrosoma, también situado en el polo anterior de la célula.



B



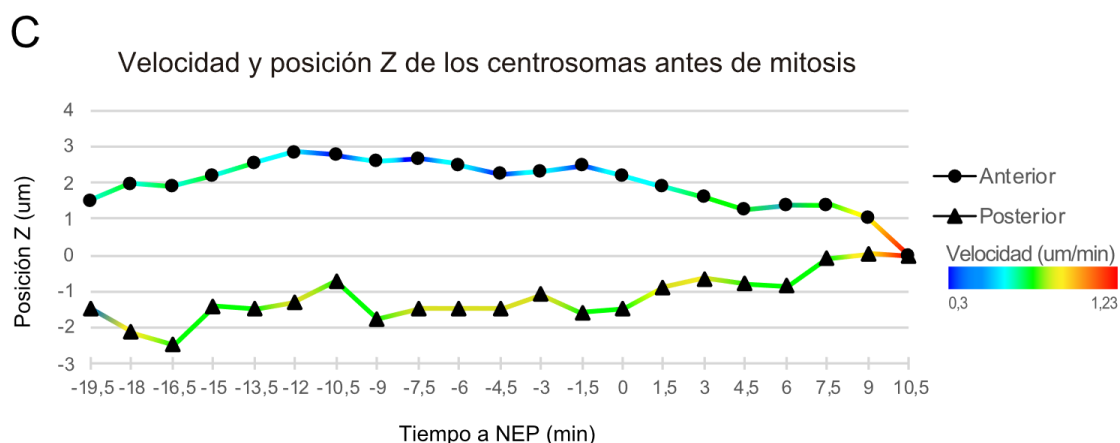


Figura 26. Dinámicas del centrosoma anterior y posterior previas a mitosis. (A-B) Cuantificación de los movimientos de centrosomas de 10 GSCs antes y después de NEP ($t=0'$), atendiendo a su velocidad de desplazamiento (A) y su posición en Z (B). Los valores individuales de cada medición se representan como círculos grises en los gráficos de cajas y bigotes. La línea oscura y las barras de error representan la media y el error estándar de la media, respectivamente. El número de centrosomas analizados en cada punto de tiempo se indica entre paréntesis. En el gráfico de la posición en Z, la línea 0 indica la posición final de los centrosomas en $t=105'$; todas las posiciones del centrosoma anterior en $t=-19,5'$ se consideran valores positivos y esta es la referencia para el sentido del resto de posiciones de ambos centrosomas. (C) Representación conjunta de las medias de velocidad y posición en z de ambos centrosomas. El punto de tiempo final corresponde a la formación de la placa metafásica. La posición de los centrosomas en la placa metafásica define $z=0 \mu\text{m}$. $n=10$

I.1.10. Las GSC tumorales se dividen simétricamente

Como se ha mostrado en esta tesis, y de acuerdo con muchos otros trabajos anteriores, el espectrosoma se divide de forma asimétrica entre las células hermanas GSC y CB. No obstante, hay menor certeza en cuanto a que sea una propiedad intrínseca de las GSCs o bien un fenómeno dependiente del nicho en el que se encuentran. Para profundizar en esta cuestión, se generaron tumores de GSCs expresando una forma activada del receptor de Dpp *thickveins* (*tkv*) en la línea germinal, gracias al promotor *nanos-Gal4* (*nanos>tkv^{Act}*) (Casanueva & Ferguson, 2004). En estos tumores, células de tipo GSC se encuentran en posiciones ectópicas, a varios diámetros celulares de distancia del nicho, definido por la posición anterior de TFs y CpCs (Fig. 27).

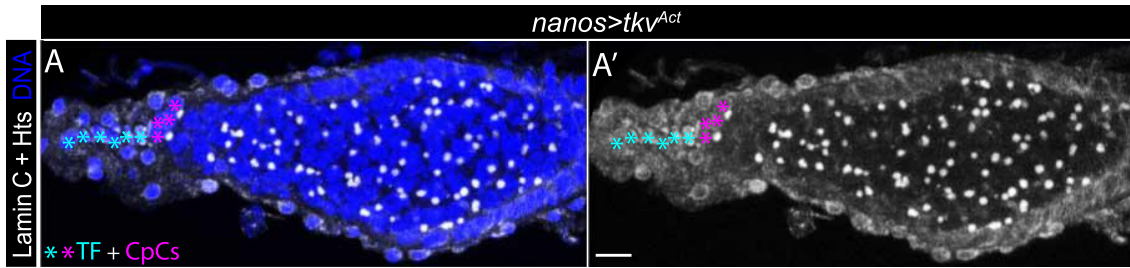


Figura 27. Tumores de células tipo GSC fuera del nicho. Tinción inmunohistoquímica de un germlarium *nanos>tkv^{Act}* con anticuerpos anti-Hts y anti-Lamin C (blanco) para marcar espectrosomas y fusomas, y CpCs, respectivamente, y con Hoechst para marcar núcleos (azul). El germlarium está repleto de células tipo GSC, que poseen espectrosomas “round”. Hay, además, una ausencia total de fusomas ramificados, indicativo de la ausencia de cistos germinales en diferenciación. Barra de escala: 10 μ m.

Para poder observar la división de GSCs ectópicas se utilizó el marcador GFP::*Par-1*. Se realizaron películas de larga duración (hasta 16 horas) de ovarios *GFP::*par-1*+nanos>tkv^{Act}* y se observaron las divisiones de GSCs, tanto de las presentes dentro del nicho como de aquellas que se encontraban alejadas de él. Se confirmó que las GSC residentes en el nicho mostraban un comportamiento de división indistinguible de las observadas en nichos control (Fig. 28; Película 15).

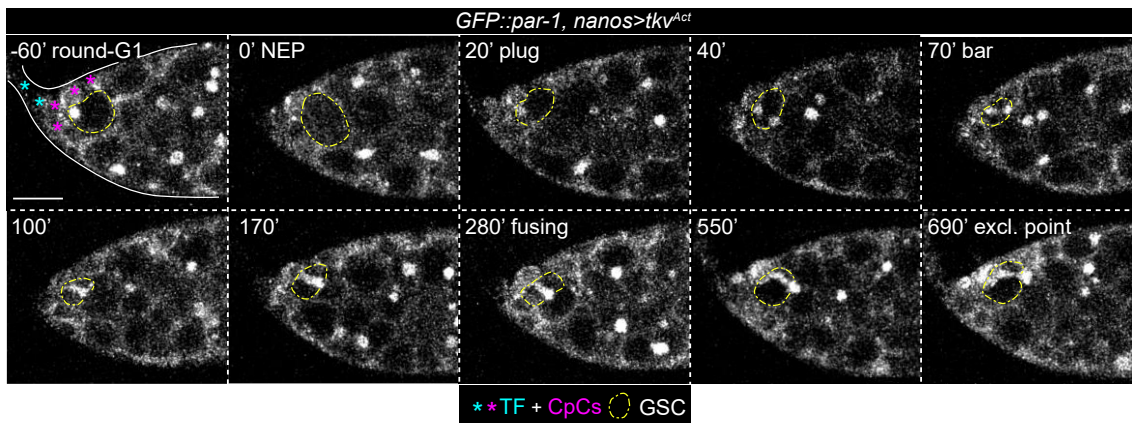


Figura 28. División de GSCs tumorales en el nicho de germlarios *nanos>tkv^{Act}*. Fotogramas de la grabación *ex vivo* de un germlarium *GFP::*par-1*, nanos>tkv^{Act}* en los que se muestra la división de una GSC que se encuentra dentro del nicho, y cuyo espectrosoma cambia de “round-G1” a “exclamation point” (t=0', NEP). Cada fotograma corresponde a una proyección máxima de 3-8 planos, cada uno de ellos tomado a 1 μ m de distancia en el eje z. La barra de escala corresponde a 10 μ m. Relacionado con Película 15.

En cuanto a las GSCs que conformaban los tumores, es de destacar que éstas mostraban un movimiento celular considerable, ya que con frecuencia cambiaban de posición continuamente, incluso sin realizar mitosis. Se capturaron cinco GSCs que realizaron mitosis y siete pares de células germinales hermanas que completaron la citocinesis durante la grabación. Se identificó que el espectrosoma se encontraba inicialmente en una zona de la célula opuesta al que sería el futuro punto de citocinesis. Tras la mitosis, el espectrosoma se desplazaba hacia la conexión intercelular GSC-CB, donde permanecía varias horas. En este periodo, el espectrosoma incorporaba nuevo material espectrosómico en ambas células hijas, creciendo progresivamente (Fig. 29; Película 16).

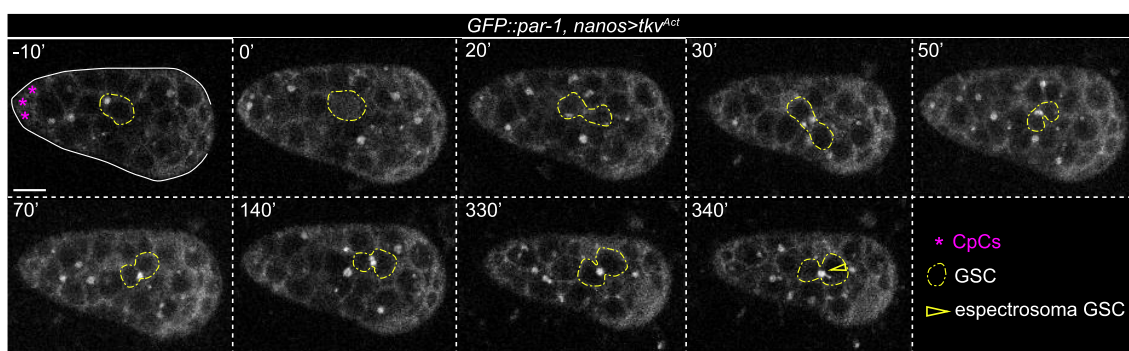


Figura 29. División de GSCs tumorales ectópicas (situadas fuera del nicho) de germlinos *nanos>tkv^{Act}*. Fotogramas de la grabación *ex vivo* de un germlino *GFP::par-1, nanos>tkv^{Act}* en los que se muestra la división de una célula tipo GSC ectópica que se encuentra alejada del nicho. El espectrosoma se encuentra inicialmente opuesto al futuro punto de citocinesis; durante mitosis ($t=0'$, NEP), se desplaza a la conexión intercelular ($t=20'$) y comienza a acumular material (ver $t=340'$). Cada fotograma corresponde a una proyección máxima de 3-8 planos, cada uno de ellos tomado a $1\mu\text{m}$ de distancia en el eje z. La barra de escala corresponde a $10\mu\text{m}$. Relacionado con Película 16.

Tras 4-6 horas, el espectrosoma se dividía entre ambas células hijas, heredando cada una de ellas un orgánulo de tamaño similar. A diferencia de las GSCs en contacto con las CpCs, que heredaban el MB post-abscisión, el MB resultante en las GSCs tumorales no parecía asociarse con ninguna de las células hijas y dejaba de apreciarse en la grabación (Fig. 30; Película 17).

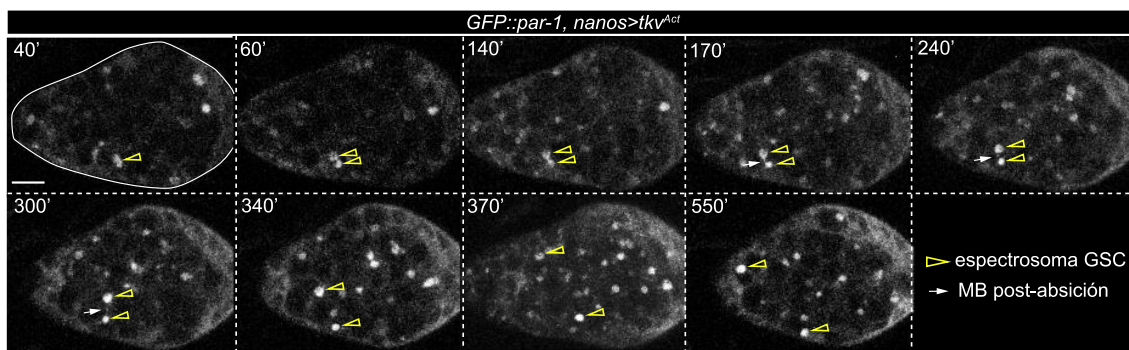


Figura 30. El espectrosoma de GSCs tumorales fuera del nicho se divide simétricamente. Fotogramas de la grabación *ex vivo* de un germario *GFP::par-1, nanos>tkv^{Act}* en los que se muestra un evento de citocinesis entre dos células hermanas, produciendo dos espectrosomas de igual aspecto. Una vez ocurrida la citocinesis ($t=60'$), se genera el MB post-absición ($t=170'$). Las células hermanas, ahora separadas, se alejan varios diámetros celulares rápidamente ($t=240-550'$). Cada fotograma corresponde a una proyección máxima de 3-8 planos, cada uno de ellos tomado a $1\mu\text{m}$ de distancia en el eje z. La barra de escala corresponde a $10\mu\text{m}$. Relacionado con Película 17.

De estas observaciones se concluyó que las células ectópicas tipo GSCs, presentes en germarios tumorales *nanos>tkv^{Act}* y que se encuentran fuera del nicho, dividen su espectrosoma de forma simétrica. Como las GSC situadas en contacto con las CpC (dentro del nicho) de estos mismos germarios muestran una segregación asimétrica del espectrosoma durante mitosis, la división asimétrica de las GSCs no es una propiedad intrínseca de estas células, sino que parece responder a la presencia del nicho.

I.2. DISCUSIÓN

I.2.1. Transporte de vesículas polarizado en las GSCs

En esta tesis doctoral, se ha mostrado *ex vivo* que la división asimétrica y auto-renovadora de la GSC se refleja en el comportamiento del espectrosoma y también en la herencia del MB post-abscisión, ya que la GSC que permanece como tal en el nicho retiene la mayor parte del material espectrosómico, así como el MB remanente. El crecimiento continuo de los espectrosomas de la GSC y el CB sugiere que estas células están sintetizando activamente material, y que debe existir un tráfico intracelular responsable del transporte hacia los espectrosomas en crecimiento. De hecho, las vesículas positivas para GFP::Par-1 que se observan dirigiéndose a espectrosomas y fusomas se asemejan a las del retículo endoplasmático o del aparato de Golgi (Lighthouse et al., 2008; Röper, 2007; Snapp et al., 2004). En el caso del espectrosoma anterior, adyacente a la roseta de las CpCs, está descrito que la forma activa de la GTPasa Rac se acumula en la interfaz GSC-nicho y que recluta a la proteína de unión a microtúbulos Apc2 para orientar el huso mitótico (Lu et al., 2012). Aunque en esta tesis no se ha observado una organización definida de microtúbulos interfásicos que confirme esta polarización en la GSC, Lu et al. sí ha descrito que la interfaz GSC-nicho posee una mayor concentración de microtúbulos, y que tanto la actina como proteínas de unión a microtúbulos, como Par-1, se acumulan en el espectrosoma. De hecho, otros autores han propuesto la existencia de un tráfico polarizado de reciclaje de endosomas positivos para Rab11 responsable de la localización anterior del espectrosoma y del mantenimiento de la correcta adhesión GSC/CpC basada en DE-cadherina (Bogard et al., 2007). Aún queda por probar que la GSC utilice esta polaridad intrínseca para organizar la maquinaria de transporte del espectrosoma, pero muy probablemente es la interfaz CpC/GSC la que juega un papel esencial en ello, ya que, incluso los espectrosomas desanclados, que sufren abscisión en la zona posterior, son luego relocalizados hacia la parte anterior, donde se fusionan con la cicatriz de material espectrosómico que se encuentra junto a la roseta de CpCs. Con relación a esto, es de destacar la importancia de la interacción CpC/GSC para el establecimiento de la polaridad anteroposterior, ya que las células tipo GSC que se encuentran a varios diámetros celulares lejos del nicho se dividen simétricamente, al menos según lo observado en el comportamiento de sus espectrosomas. Esto indicaría que, en el caso de las GSC de la hembra, el resultado asimétrico de su división depende considerablemente del microambiente adyacente.

I.2.2. Posible papel de Par-1 en la división de GSCs

La localización de la kinasa Par-1 en la GSC de la hembra podría indicar que ésta tiene una función en la regulación del ciclo celular. Par-1, al igual que la proteína Hts, es uno de los componentes principales de los espectrosomas y fusomas, en los que puede encontrarse decorando las diferentes morfologías características del espectrosoma de fases G1, S y G2 y los fusomas de los cistos de la línea germinal. También está presente en el nuevo material que se fusiona con los espectrosomas en crecimiento de GSCs y CBs. Sin embargo, durante mitosis, Par-1 pierde su localización en el espectrosoma y se traslada brevemente al citoplasma antes de recuperar su asociación con el espectrosoma, un fenómeno que ocurre igualmente en los fusomas de los cistos en diferenciación. A este respecto, cabe destacar que las GSCs del macho, que también poseen espectrosomas positivos para Par-1 en interfase y pierden la señal durante mitosis (Yuan et al., 2012), cuentan con un checkpoint de orientación de centrosomas (COC) que asegura la división asimétrica. El COC detiene el ciclo celular en G2 si los centrosomas no se han orientado correctamente (Venkei & Yamashita, 2015; Yamashita, 2018; Yuan et al., 2012). Par-1 es un componente importante del COC, en el que actúa para asegurar que CycA se localice en el espectrosoma durante G2, evitando así una entrada precoz en mitosis cuando los centrosomas aún no se han alineado debidamente. Una vez iniciada la profase, CycA se libera del espectrosoma y se degradará rápidamente en metafase (Yuan et al., 2012). En el ovario, CycA también se asocia con el espectrosoma y fusoma en G2/M (Lilly et al., 2000), lo que abre la posibilidad de que Par-1 participe en el control del ciclo celular a través de la localización de CycA en el espectrosoma de G2 y liberándolo en mitosis. También cabe la posibilidad de que Par-1 se requiera para la correcta formación de la red de microtúbulos en células germinales en división, ya que esta proteína Par-1 participa en la regulación de la organización de microtúbulos (Cox et al., 2001; Huynh et al., 2001; Shulman et al., 2000) y se libera del espectrosoma de GSCs y CBs (y de los fusomas de los cistos) justamente durante la reorganización del citoesqueleto de microtúbulos en la mitosis de estas células.

I.2.3. El ciclo del centrosoma en las GSCs de la hembra

En las células eucariotas, el ciclo canónico del centrosoma establece que la duplicación de los centriolos ocurre en fase S y que los centrosomas hermanos se separan antes de mitosis. Por tanto, las células en fase G1 y S poseen sólo un centrosoma. Sin embargo, estudios del comportamiento del centrosoma en diversos tipos de células troncales describen diferencias

considerables. Por ejemplo, en los neuroblastos (NBs) de *Drosophila*, que son las células troncales del sistema nervioso central de la mosca, el centrosoma se separa durante la salida de mitosis y con anterioridad a la duplicación de sus centriolos. El centrosoma antiguo o “madre” y el centrosoma nuevo o “hijo” presentan diferente actividad nucleadora de microtúbulos, siendo el centriolo hijo el más activo. Además, la célula que permanece como NB retiene el centrosoma que contiene el centriolo hijo, mientras que la célula ganglionar hermana hereda el que contiene el centriolo madre (Conduit & Raff, 2010; Januschke et al., 2011; Rebollo et al., 2007; Rusan & Peifer, 2007). En las GSCs del macho, la separación de centrosomas ocurre en G2, después de la duplicación de centriolos en fase S (Yamashita et al., 2007), y los centrosomas hermanos se orientan de manera que el centrosoma madre siempre se posiciona junto a las células del nicho. Por tanto, en una división asimétrica, la célula que permanece como GSC hereda el centrosoma madre. Los resultados de este trabajo de tesis muestran que las GSC de la hembra tienen un comportamiento más parecido al de los NBs, ya que sus centrosomas se separan muy pronto en G1, antes de la duplicación de centriolos. No se ha determinado aquí qué tipo de centrosoma hereda la GSC, pero en la literatura podemos encontrar que se propone que es el centrosoma hijo (Salzmann et al., 2014). Sin embargo, creemos que esta propuesta debería ser revisada. La observación de esta propuesta se basa en que, en las GSCs con un espectrosoma “round” y con centrosomas orientados, en los que uno de ellos es positivo para Cnb (marcador de centriolo hijo) y el otro negativo, el positivo está asociado al espectrosoma en la mayoría de casos. Los autores asumen que estas GSCs contienen centrosomas inmaduros, que poseen cada uno sólo un centriolo, y que las GSCs se encuentran en G2, concluyendo que el centrosoma hijo lo hereda preferentemente la GSC. Sin embargo, los resultados de este trabajo de tesis muestran que GSCs con un centrosoma positivo para Cnb y con un espectrosoma “round” se encuentran en fase G1. Por tanto, la posición anterior del centrosoma hijo (conteniendo un centriolo positivo para Cnb) no indica necesariamente que vaya a permanecer en la GSC.

I.2.4. El ciclo celular en las GSCs de la hembra

Los análisis realizados en este trabajo de tesis, con muestra viva y fijada, han arrojado resultados consistentes con respecto a la duración media de las fases del ciclo celular, según lo observado en las morfologías del espectrosoma, los marcadores del comportamiento de la cromatina y el código de colores de la herramienta Fly-FUCCI. Así, la fase M ocupa un 2.4%

del ciclo en las películas ex vivo; G1 (morfologías del espectrosoma “round-G1”, “plug” y “bar”) un 24.7% en muestra viva y un 21.9% en fijada; S un 4.7% en viva y un 7.6% en fijada (estos valores se calculan considerando que, de acuerdo a los datos de Fly-FUCCI, casi un 27% de las GSCs con morfología “fusing” se encontraban en fase S y el 73% restante en G2); y G2 ocupa un 68.5% en muestra viva y un 70.5% en fijada. Considerando que, en las condiciones experimentales empleadas en este trabajo, una GSC se divide por término medio cada 15.5 horas, M debe tener una duración de 22 minutos, G1 de 3.45 horas, S de 43 minutos y G2 de 10.5 horas. Sin embargo, el tiempo de proliferación de cada GSC debe ser bastante variable, teniendo en cuenta la dispersión en la duración de las diferentes morfologías del espectrosoma observada ex vivo (con la excepción de la fase M).

La corta duración de la fase G1 y la extensa de G2, características de las GSCs de la hembra, son comunes a otros tipos células troncales; la regulación de este ciclo celular característico guarda una relación importante con la potencialidad de estas células, aunque se desconocen los detalles moleculares de dicha regulación (Hinnant et al., 2020). Es interesante mencionar que se ha propuesto que las células troncales poseen una fase G1 corta para retener un estado pluripotente e indiferenciado, y que la ratio de la fase S con respecto a las fases *gap* cambia con el grado de diferenciación de la célula. De hecho, las células troncales embrionarias de ratón (con un gran potencial de desarrollo) tienen una fase G1 relativamente corta durante la cuál se considera que son vulnerables a señales de diferenciación (Coronado et al., 2013). Que las GSCs de la hembra de *Drosophila* posean una estrategia similar y cuenten con una fase G1 corta para evitar una diferenciación no deseada requiere una mayor investigación.

CAPÍTULO II

Implicaciones de proteínas reguladoras de la matriz extracelular en células troncales: observación del comportamiento de GSCs mutantes *timp*

II.1. RESULTADOS

El segundo objetivo de esta tesis se centra en analizar la contribución del estado de la ECM en el mantenimiento de células troncales. Como se mencionó en la introducción, la ausencia del inhibidor de metaloproteinasas TIMP disminuye la rigidez de la BM en el modelo del germario de *Drosophila* (Pearson et al., 2016). Partiendo de las observaciones recogidas en el trabajo de Pearson et al. (2016), realizado con anterioridad en el laboratorio de Acaimo González Reyes, en esta tesis se analiza el comportamiento de las GSCs en ovarios mutantes para *timp*. Los resultados de esta sección corresponden por tanto al Objetivo 2 de la tesis.

II.1.1. La duración de la división celular de las GSCs no es superior en mutantes *timp*

El fenotipo descrito en ovarios mutantes *timp* incluía la pérdida progresiva de la estructura del germario y una reducción general en la homeostasis del tejido. Estos efectos, que se traducían en una disminución paulatina del número de cistos en los germarios, se agravaban con la edad del individuo, hasta presentar incluso ovariolas completamente vacías en ovarios mutantes *timp* de 4 semanas de edad (Pearson et al., 2016). Concretamente, Pearson et al. describió que esta disminución en la homeostasis no era consecuencia de que el mutante poseyera un menor número de GSCs por nicho, sino de una menor eficiencia de producción de cistos por parte de las GSCs mutantes *timp*. Por ejemplo, hembras mutantes *timp* de 1 semana producían sólo un 60.7% de cistos con respecto al control. A partir de esta observación, en este trabajo de tesis se procedió a analizar si existía alguna alteración en la división de las GSCs mutantes *timp* que diera lugar a una menor producción de cistos.

Al igual que en el trabajo de Pearson et al., en esta tesis la condición nula para *timp* se establece mediante la combinación del alelo *timp*²⁸, que alberga la delección del gen, con la deficiencia Df (3R) ED5472 (*timp*²⁸/Df (3R) ED5472, en adelante *timp*⁻). Dado que el fenotipo *timp*⁻ empeora con el envejecimiento, se analizaron GSCs procedentes de hembras de dos grupos de edad: un grupo joven de 1 semana y un grupo envejecido de 2 semanas. No se emplearon hembras de edad superior ya que la desorganización del ovario que presentan éstas dificultaba la manipulación de las muestras y, además, no se podían discernir efectos pleiotrópicos asociados a la pérdida de estructura del germario de variaciones genuinas en el comportamiento de las GSCs.

Para cada grupo de edad, se realizaron películas *ex vivo* de germarios control y *timp*⁻, durante 2 horas, capturando imágenes cada 1.5 minutos. Tanto germarios control (TM2/TM6B) como *timp*⁻ (*timp*²⁸/Df (3R) ED5472) expresaban de forma ubicua YFP::Asterless (YFP::Asl; para marcar centrosomas), GFP::αTubulin (GFP::αTub; microtúbulos) y Histone 2AV::mRFP (His::RFP; cromatina). Las referencias utilizadas para definir el inicio y el final de cada evento de división fueron, respectivamente, NEP (t=0') y la aparición del “spindle MB” (Figura 31; Películas 18-21). Como se ha descrito en el Capítulo I, ambos fenómenos pueden detectarse gracias especialmente a la dinámica de la señal GFP::αTubulin, que inunda el nucleoplasma en NEP y demarca un haz denso de microtúbulos cuando se establece el “spindle MB”. Por tanto, se cuantificó la duración de la división como el tiempo transcurrido desde NEP hasta “spindle MB”. Las películas generadas para este análisis se obtuvieron en colaboración con la Dra. Miriam Marín Menguiano.

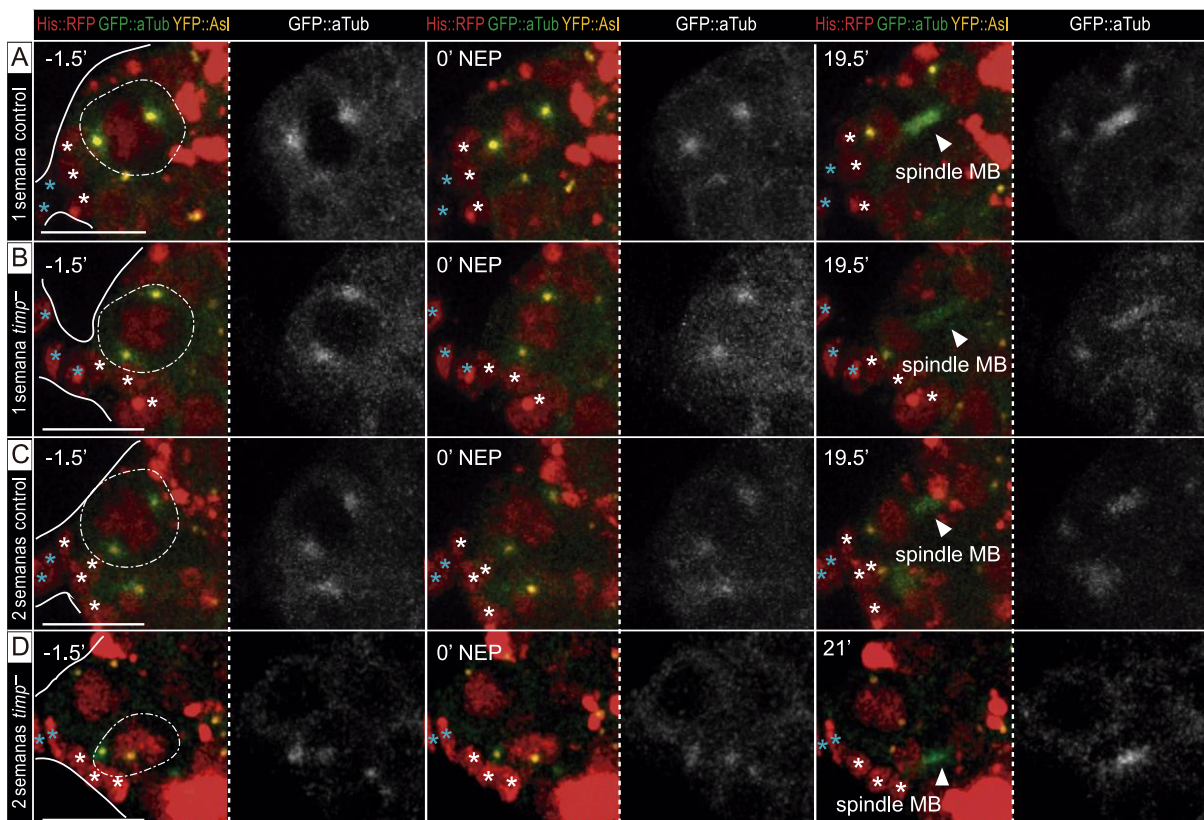


Figura 31. Análisis *ex vivo* de la duración de división celular en GSCs control y *timp*⁻. Fotogramas de la grabación *ex vivo* de germarios *YFP::asl*, *GFP::atub*, *his::RFP* control y *timp*⁻ de 1 semana (A, B) y 2 semanas (C, D) que muestran ejemplos del tiempo transcurrido desde la aparición de NEP (t=0') hasta el establecimiento del “spindle MB”. Detalle del canal correspondiente a la señal de GFP::αtub

para destacar la entrada de α -tubulina en NEP y la intensidad del “spindle MB”. Cada fotograma corresponde a una proyección máxima de 3-8 planos, cada uno de ellos tomado a $1\mu\text{m}$ de distancia en el eje z. **(A)** relacionado con Película 18, **(B)** con Película 19, **(C)** con Película 20 y **(D)** con Película 21. La barra de escala corresponde a $10\mu\text{m}$. La línea blanca discontinua destaca GSCs, los asteriscos azules y blancos destacan células del TF y CpCs, respectivamente.

La duración media de la división de una GSC en moscas control de 1 semana correspondía a 19 ± 0.56 min ($n=12$); la de una GSCs mutante *timp* a 20.25 ± 1.35 min ($n=16$). En el grupo de 2 semanas, la división de las GSCs control tenía una duración media de 20.1 ± 0.33 min ($n=10$) y la de GSCs mutantes *timp* de 20.72 ± 0.55 min ($n=16$) (Figura 32). No se observó ninguna diferencia significativa en la duración de eventos de división en GSCs *timp*⁻ con respecto al control, tanto en el grupo correspondiente a 1 semana como en el de 2 semanas. En todos los casos, la duración media de las divisiones fue de aproximadamente 20 minutos. Por tanto, la duración del proceso de división celular para GSCs *timp*⁻ es similar a los controles.

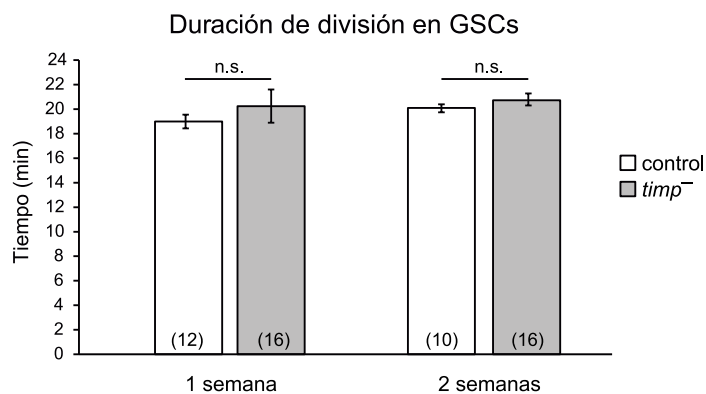


Figura 32. Duración de división celular en GSCs *timp*⁻. Cuantificación de la duración de división de GSCs control (blanco) y *timp*⁻ (gris), en grupos de hembras de 1 y 2 semanas de edad. Representación de la media aritmética y el error estándar de la media. La n de cada muestra se indica entre paréntesis. La significancia estadística entre muestras se analizó mediante la prueba t de Student (n.s., no significativo).

II.1.2. Los centrosomas anterior y posterior premitóticos son menos dinámicos en GSCs *timp*⁻

Como se ha descrito en el Capítulo I de esta tesis, en el proceso de división de las GSCs se pueden distinguir eventos que tienen lugar antes de NEP, como son el anclaje de los centrosomas, el aumento de nucleación de microtúbulos y la condensación de cromatina. Se decidió extender el análisis de los fenómenos de división hasta el evento más temprano, es decir, el relacionado con la dinámica de los centrosomas y su posicionamiento con respecto al eje de división, para determinar si los mutantes *timp* presentaban un comportamiento diferente a los controles.

Se analizó en detalle la dinámica de los centrosomas, cuantificando la posición media en el eje z y la velocidad media de desplazamiento de los centrosomas anterior y posterior en 28 puntos de tiempo, desde los -30 minutos hasta los 10.5 minutos con respecto a NEP. Se analizaron 9 GSCs control y 10 GSCs *timp*⁻ correspondientes a 1 semana de edad, y 9 GSCs control y 9 GSCs *timp*⁻ de 2 semanas, procedentes todas ellas de las grabaciones ex vivo de germarios *YFP::asl*, *GFP::atub*, *his::RFP* que capturaron el tiempo suficiente anterior a una división.

En las GSCs control de 1 semana, ambos grupos de centrosomas se movían en un rango de 2 μm en el eje z con respecto a la placa metafásica final, mostrando los centrosomas posteriores mayor velocidad media en sus desplazamientos que los anteriores (Fig. 33; Fig. S1A,C en págs. 78, 80). En el caso de las GSCs *timp*⁻, el rango de movimiento en el eje z de ambos grupos de centrosomas se reducía a 1 μm de media sobre la placa metafásica. En concreto, los centrosomas posteriores apenas distanciaban su desplazamiento en z de la que iba a ser su posición final en metafase (Fig. 33; Fig. S1B en págs.79). Además, la velocidad media de desplazamiento entre puntos de tiempo de ambos grupos de centrosomas anterior y posterior en GSCs *timp*⁻ era inferior a la observada en los centrosomas control (Fig. 33; Fig. S1C,D en págs. 80, 81).

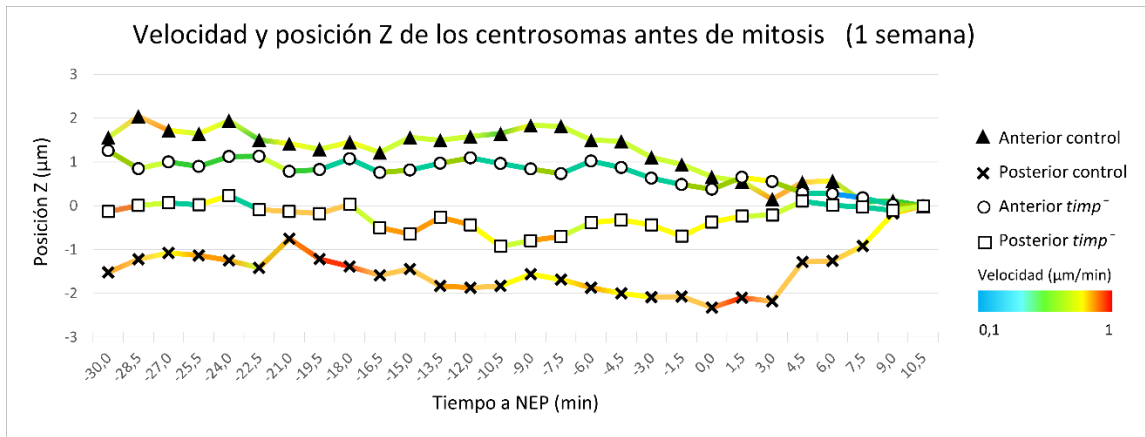


Figura 33. Dinámicas de centrosomas anteriores y posteriores premitóticos en GSCs control y *timp*⁻ de 1 semana. Representación conjunta de las medias de velocidad y posición en z de los centrosomas de GSCs control (n=9) y *timp*⁻ (n=10) procedentes de hembras de 1 semana. El punto de tiempo final corresponde a la formación de la placa metafásica (NEP, t=0'). La posición de los centrosomas en la placa metafásica define z=0 µm. Los datos individuales se muestran en las gráficas Fig. S1. en págs. 78-81.

En el conjunto de GSCs control de 2 semanas, nuevamente ambos grupos de centrosomas se movían de media en el eje z en un rango de 2 µm con respecto a la placa metafásica final (Fig. 34; Fig. S2A en pág. 82). En las GSCs *timp*⁻, mientras que los centrosomas anteriores mantenían su rango de desplazamiento muy limitado con respecto a la placa metafásica (1 µm), los posteriores ampliaban su desplazamiento en el eje z hasta las 2 µm (Fig. 34; Fig. S2B en pág. 83). Al igual que ocurría en 1 semana, la velocidad media de movimiento entre puntos de tiempo era inferior a las observadas en los centrosomas control (Fig. 34; Fig. S2C, D en págs. 84, 85).

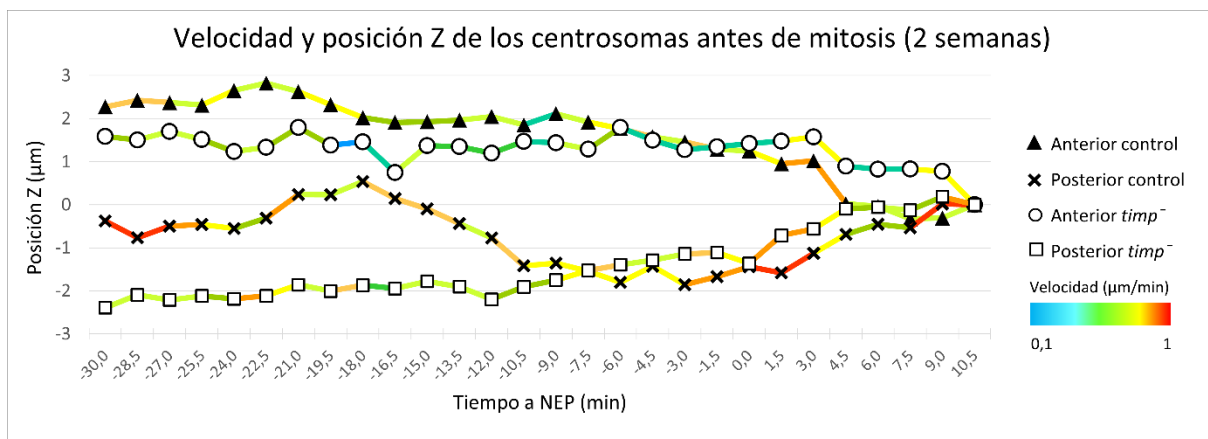


Figura 34. Dinámicas de centrosomas anteriores y posteriores premitóticos en GSCs control y *timp*⁻ de 2 semanas. Representación conjunta de las medias de velocidad y posición en z de los

centrosomas de GSCs control (n=9) y *timp*⁻ (n=9) procedentes de hembras de 2 semanas. El punto de tiempo final corresponde a la formación de la placa metafásica (NEP, t=0'). La posición de los centrosomas en la placa metafásica define z=0 μm. Los datos individuales se muestran en las gráficas Fig. S2 en págs. 82-85.

En definitiva, estos resultados muestran que los centrosomas anterior y posterior de GSCs *timp*⁻ son menos dinámicos que los controles, al menos durante los 30 minutos previos a NEP. Visto que ambos centrosomas son capaces de nuclear microtúbulos, es posible que su movimiento dependa de éstos. Así, nuestros resultados indicarían que el citoesqueleto de microtúbulos de las GSCs mutantes pueda estar alterado.

II.1.3. La progresión del ciclo celular está alterada en GSCs mutantes *timp* de 1 semana: sus fases G1 + S tienen mayor duración

Dado que no se observó que el proceso de división celular (desde NEP hasta la formación del “spindle-MB”) ocurriera más lentamente en *timp*⁻, se procedió a analizar si el resto de fases del ciclo celular sufría alguna alteración en las GSCs mutantes que derivara en una menor generación de cistos. Para ello, se empleó la aproximación de análisis del ciclo celular descrita en el Capítulo I, por la que se identifica la fase del ciclo en el que se encuentran las células en función de la expresión de los marcadores FlyFUCCI y de la morfología del espectrosoma.

Se analizó la expresión de los marcadores de ciclo celular Fly-FUCCI junto con las diferentes morfologías del espectrosoma en 105 GSCs control y 83 GSCs *timp*⁻, ambos conjuntos procedentes de hembras de 1 semana y teñidos con anticuerpos anti-LaminC y anti-Hts para marcar, respectivamente, CpCs y los espectrosomas/fusomas, junto con Hoechst para visualizar los núcleos (Fig. 35). En el control, el 21.9% de las GSCs se encontraban en fase G1, el 7.6% en fase S y el 70.5% en G2/M, mientras que en el mutante *timp* 32.5% de las GSCs correspondían a G1, 2.4% a S y 65.1% a G2/M (Fig. 36).

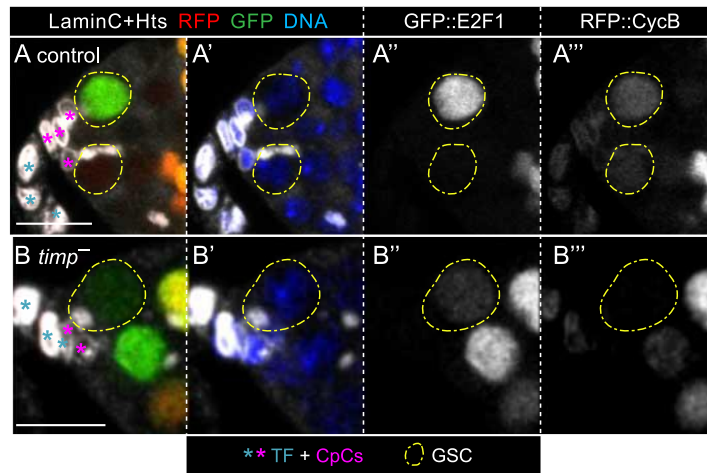


Figura 35. Correspondencia entre marcadores Fly-FUCCI y espectrosomas en GSCs fijadas control y $timp^-$ de 1 semana. Tinción inmunohistoquímica de germarios $nanos>GFP:E2F1+mRFP1:NLS-CycB$ (control) y $nanos>GFP:E2F1+mRFP1:NLS-CycB; timp^{28}/Df(3R) ED5472 (timp^-)$ con anticuerpos anti-Hts y anti-Lamin C para marcar espectrosomas y CpCs respectivamente (blanco), y Hoechst para marcar núcleos (azul). Las señales de GFP::E2F1 (verde) y RFP::CycB (rojo) corresponden a la fluorescencia endógena de los degrones y no están amplificadas mediante tinción inmunohistoquímica. **(A)** GSCs control. La célula superior se encuentra en fase G2/M (GFP+ y RFP+ con espectrosoma “round”), mientras que la inferior está en fase S (GFP- y RFP+ con espectrosoma “fusing”). **(B)** GSC $timp^-$ en fase G1 (GFP+ y RFP- con espectrosoma “round”). La barra de escala corresponde a 10 μ m.

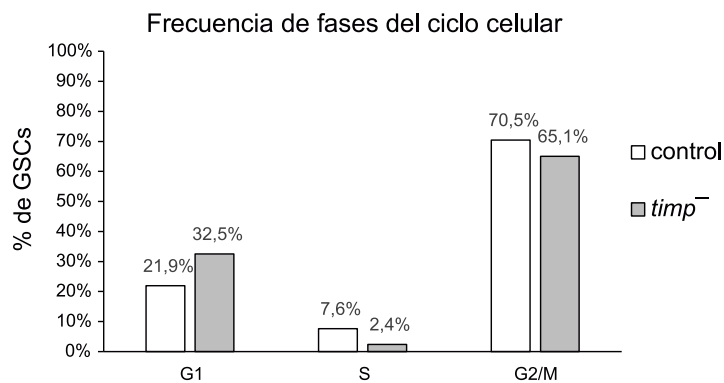


Figura 36. Distribución de las fases del ciclo celular según marcadores Fly-FUCCI y espectrosomas en GSCs fijadas control y $timp^-$ de 1 semana. Porcentajes de GSCs en G1, S o G2/M en muestra control (n=105) y $timp^-$ (n=83). La significancia estadística entre muestras se analizó mediante la prueba X^2 (chi cuadrado), arrojando un valor p-valor de 0.1037.

Dado que este experimento no informaba acerca de la duración concreta de las fases, de forma paralela se cuantificó dicha duración mediante películas *ex vivo* de larga duración, capturando imágenes cada 10 minutos de germarios *nanos>GFP:E2F1+mRFP1:NLS-CycB*. En este experimento se analizaron 6 GSCs control y 8 GSCs *timp⁻* procedentes de hembras de 1 semana. (Películas 22 y 23).

Debido a que estas GSCs no contaban con un marcador para visualizar el espectrosoma y no se podía discernir el final de la fase G1 y el comienzo de S durante la ausencia de marcadores FlyFUCCI, se cuantificó la duración de fases M y el conjunto de G1/S. Además, no fue posible cuantificar la fase G2 porque no se llegó a capturar de forma continua las transiciones de color que indican su inicio y final. Este análisis mostró que, en el caso control, la fase M tenía una duración de 20 ± 0 min y la fase G1/S de 240 ± 17.32 min, mientras que en el mutante *timp* M duraba 22 ± 1.67 min y G1/S 330 ± 41.13 min (Fig. 37). Estos resultados corroboraron las observaciones anteriores que indicaban que la duración de la fase M en *timp⁻* es similar al control mientras que G1/S es significativamente más larga en *timp⁻*.

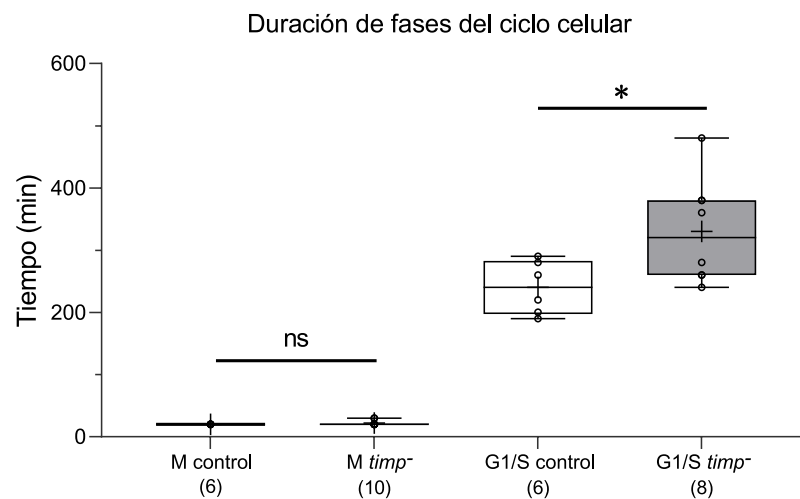


Figura 37. Cuantificación de la duración de M y G1+S en control y *timp⁻* de 1 semana. Se muestran los valores obtenidos, la media (cruces) y la mediana (línea horizontal que cruza las cajas). La n se indica entre paréntesis. La significancia estadística entre muestras se analizó mediante la prueba t de Student (n.s., no significativo; *, $p < 0.05$).

Habiendo observado una diferente duración de, al menos, una parte del ciclo (conjunto de fases G1+S) en las GSCs *timp*⁻, se procedió a determinar si esto conllevaba que la duración total del mismo estaba afectada. Para ello, se intentó reconstruir el ciclo a través del seguimiento *ex vivo* de la morfología del espectrosoma. Utilizando el marcador YFP::Par1, generado con anterioridad a este trabajo de tesis por el Dr. Federico Zurita Martínez (Universidad de Granada) en colaboración con el laboratorio del Dr. Acaimo González, se capturaron transiciones de morfología de espectrosoma en 15 GSCs control procedentes de 11 germarios diferentes y 27 GSCs *timp*⁻ procedentes de 22 germarios diferentes de 1 semana (Figura 38). En estas GSCs, se cuantificaron aquellas transiciones de morfología en las que se podía identificar inequívocamente su inicio y final, como se describe en el Capítulo I de esta tesis.

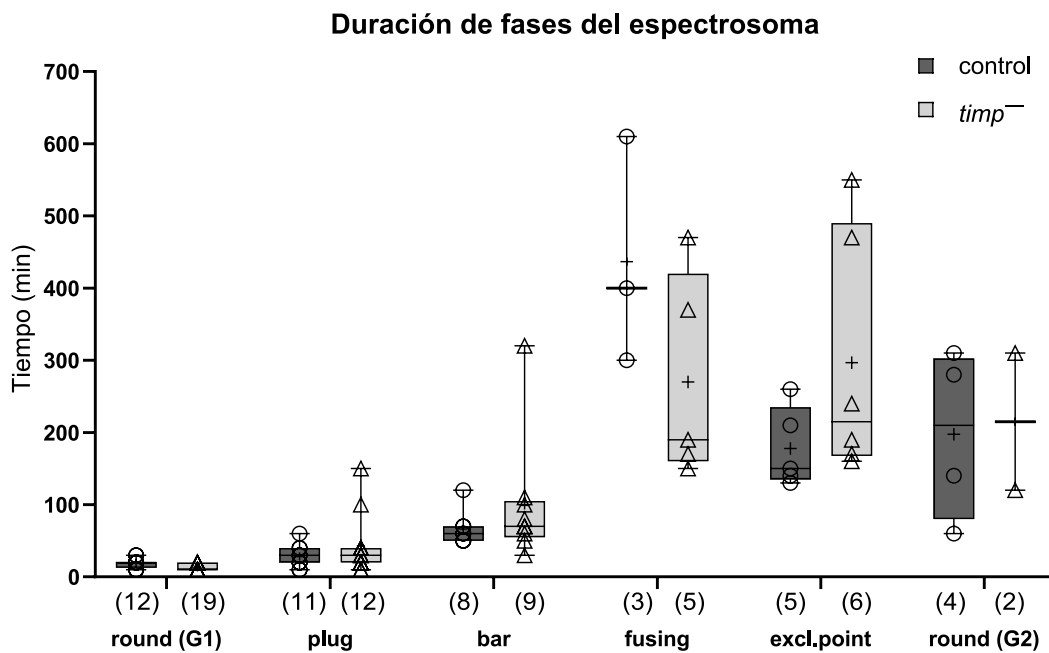


Figura 38. Duración de las morfologías del espectrosoma de GSCs control y *timp*⁻ de 1 semana. Los valores individuales se representan como círculos grises en el diagrama de cajas y bigotes. La media se representa con una cruz y la mediana con una línea horizontal. La n se muestra entre paréntesis.

	round(G1)	plug	bar	fusing	excl. Point	round(G2)	total
control	19.17 ± 1.93	28.18 ± 4.44	66.25 ± 8.22	436.67 ± 91.35	178 ± 24.78	197.5 ± 58.93	925.77
<i>timp</i> ⁻	13.16 ± 1.1	42.5 ± 11.94	98.89 ± 28.79	270 ± 63.56	296.67 ± 69.17	215 ± 95	936.21

TABLA 1. Media, error estándar de la media y total estimado del ciclo en la cuantificación de duración de morfologías del espectrosoma en GSCs control y *timp*⁻ de 1 semana (min).

Los datos obtenidos por este análisis *ex vivo* permitieron estimar una duración total del ciclo, calculada como la suma de las medias de la duración de cada morfología, similar para las GSCs controles y *timp*⁻ de 1 semana. Aunque los datos de las morfologías de mayor duración (“fusing”, “exclamation point” y “round-G2”) fueron escasos y con una dispersión considerable, nuestras observaciones anteriores ya indicaban que el sistema presentaba una gran variabilidad que reflejaba duraciones de fases del espectrosoma muy distintas para GSCs del mismo germario (por ejemplo, fases “bar” con duraciones de 30’ o 230’ recogidas en los resultados del Capítulo I). Esta variabilidad intrínseca de la duración de las fases del ciclo del espectrosoma podría explicar también las diferencias detectadas entre los controles de la TABLA 1 y los de la Figura A5A. En conclusión, nuestros datos de muestras fijadas y del análisis de muestras *ex vivo* indican que las GSCs mutantes se dividen con una frecuencia similar a las control y que la alteración observada en el ciclo es probable que se limite al conjunto de fases G1/S.

A diferencia de los análisis de la duración de la fase M y del comportamiento de los centrosomas, el estudio de la duración de las fases del ciclo, la cuantificación de la duración de fases *ex vivo* y la reconstrucción del ciclo por morfología del espectrosoma se realizaron solo en GSCs procedentes de hembras de 1 semana por falta de tiempo para abordar los experimentos con moscas de 2 semanas a lo largo de esta tesis. El análisis de Fly-FUCCI en GSCs *timp*⁻ fijadas y *ex vivo* se hizo en paralelo con sus respectivos controles. Los datos de dichos controles, que aparecen en las Figs. 36 y 37, son los descritos en el Capítulo I, Figs. F2 y F4.

II.1.4. Presencia de daño en DNA y actividad de p53 en GSCs mutantes *timp*

Para estudiar si el aumento observado en la duración de las fases G1 + S se debía a un arresto transitorio del ciclo provocado por la presencia de daño en DNA, se analizaron los niveles del marcador γ -H2Av en muestra fijada. La forma fosforilada de la variante de histona 2A en *Drosophila* (γ -H2Av) es indicativa de la presencia de roturas de doble cadena o *double strand breaks* (DSBs) en el DNA (Jang et al., 2003). Se empleó un anticuerpo anti- γ -H2Av junto con Hoechst para visualizar los núcleos y rodamina faloidina para visualizar membranas y fusomas (marcaje de actina) (Fig 39). Se cuantificó el porcentaje de células positivas para el marcador γ -H2Av en grupos de GSCs control y *timp*⁻ procedentes de hembras de 1 y 2 semanas (Fig 40). La toma de imágenes y la cuantificación para este análisis se realizó en colaboración con la Dra. Miriam Marín Menguiano.

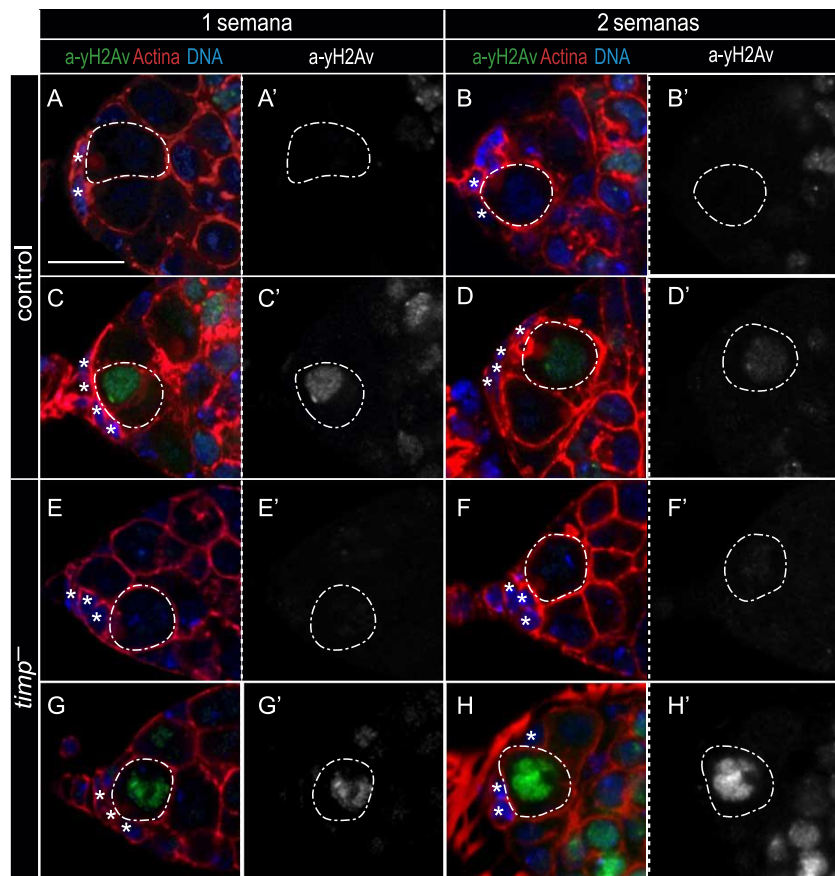


Figura 39. Presencia del marcador de daño en DNA γ -H2Av en GSCs control y *timp*⁻. Tinción inmunohistoquímica de germarios control (B-D) y *timp*⁻ (E-H) con anticuerpos anti- γ -H2Av para detectar presencia de DSBs (verde), rodamina faloidina para marcar membranas y fusomas (rojo) y Hoechst para marcar núcleos (azul). La columna de la izquierda corresponde a muestras de 1 semana y la columna de la derecha a 2 semanas. Se muestran GSCs negativas en los paneles A, B, E, F; GSCs

positivas en los paneles C, D, G, H. La barra de escala corresponde a 10 μm . La línea blanca discontinua destaca GSCs, los asteriscos blancos destacan CpCs.

En el grupo correspondiente a hembras de 1 semana, se analizaron 99 GSCs *timp*⁻ frente a 110 GSCs control. En este grupo de edad, el 8.08% de las GSCs mutantes *timp* resultaron positivas para el marcador α -YH2AV frente al 4.55% de las GSCs control. En el grupo de hembras de 2 semanas, se analizaron 73 GSCs *timp*⁻ frente a 81 GSCs control, observándose un 24.66% de positivas en el mutante frente a 9.88% en el control (Figura 40). Los resultados mostraron un incremento del número de GSCs positivas para γ -H2Av conforme aumentaba la edad de la hembra en *timp*⁻, lo que sugería un defecto en la reparación de DSBs en las GSCs mutantes.

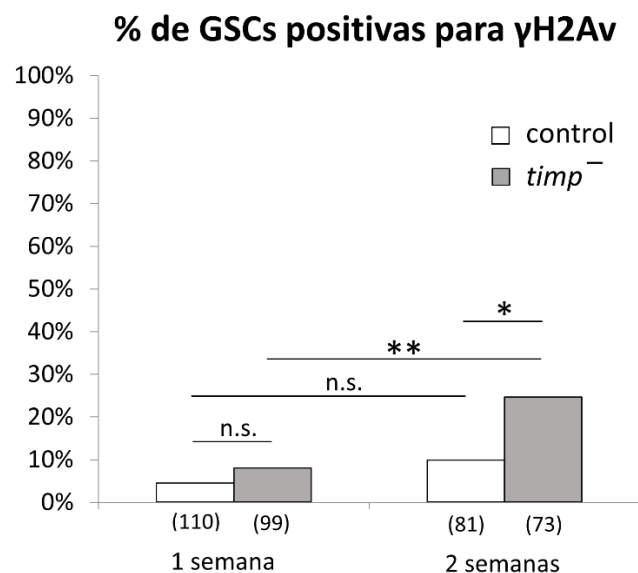


Figura 40. Porcentaje de GSCs positivas para el marcador γ -H2Av en muestras control y *timp*⁻. Cuantificación del porcentaje de GSCs control y *timp*⁻ que son positivas para presencia de DSBs a 1 semana y 2 semanas. La n se indica entre paréntesis. La significancia estadística entre muestras se analizó mediante el test exacto de Fisher (n.s., no significativo; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$).

Habiendo observado una reparación aberrante de cortes de doble cadena en los núcleos de hembras *timp*⁻ envejecidas, y dado que p53 es un elemento común aguas abajo de las cascadas de respuesta a daño en DNA, se analizó a continuación la actividad de esta proteína en los mutantes *timp*. En GSCs silvestres, se ha descrito una función protectora de p53 que evita la

pérdida de GSCs del nicho inducida por daño en DNA (Ma et al., 2016; Wylie et al., 2014). A pesar de que GSCs *timp*⁻ muestran un incremento de DSBs, el número de GSCs por nicho en mutantes *timp* no es significativamente diferente a los controles (Pearson et al., 2016; Figura 41). Por ello, se decidió estudiar si la actividad protectora de p53 estaba evitando la pérdida de GSCs en germarios *timp*⁻. Para ello, se empleó una condición mutante de p53 mediante la combinación del alelo *p53*^{5A-1-4}, que alberga la deleción del gen, con el alelo *p53*^{11-1B-1}, que provoca un codón de parada prematuro (*p53*^{5A-1-4}/*p53*^{11-1B-1}, en adelante *p53*⁻). Primero, se comprobó que la eliminación de p53 inducía pérdida de GSCs en germarios control de 1 y 2 semanas (*yw* frente a *timp*⁺ *p53*⁻; sin embargo, ver Fig. S2 de Ma et al., 2017). A continuación, se cuantificó el número de GSCs en un fondo mutante para *timp* con y sin p53. Sorprendentemente, la presencia o ausencia de p53 no supuso una diferencia significativa en el número de GSCs en moscas mutantes *timp* de 1 o 2 semanas (*timp*⁻ *p53*⁺ frente a *timp*⁻ *p53*⁻; Fig. 41).

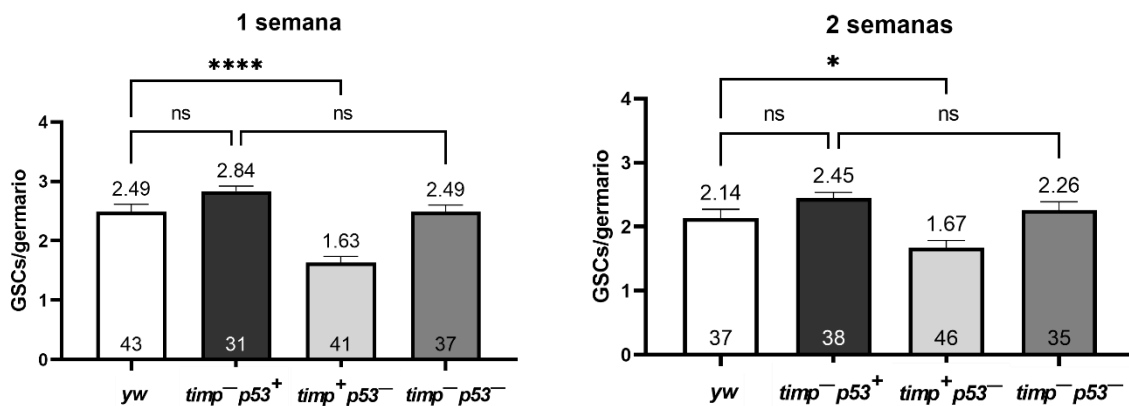


Figura 41. Número de GSCs por germario y su relación con los genes *timp* y *p53*. Representación de la media aritmética y el error estándar de la media. La n de cada muestra se indica en el interior de las barras. La significancia estadística entre muestras se analizó mediante análisis ANOVA de una vía, seguido de un test múltiple de Tukey (n.s., no significativo; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

Por tanto, estos resultados sugieren que el mantenimiento del número de GSCs por nicho en mutantes *timp* es independiente de la actividad protectora de p53.

Finalmente y considerando el papel que el complejo LINC juega en la reparación de daño a DNA (revisado en Lambert, 2019) se planteó la posibilidad de que la deficiente reparación de los DSBs en mutantes *timp* fuese debida a una alteración en la comunicación biomecánica entre núcleo y citoplasma, derivada de la diferente consistencia de la matriz extracelular en la que se encuentran estas células mutantes. Según esta hipótesis, si la ausencia de *timp* provoca una desconexión entre el cito- y el nucleo-esqueleto que, a su vez, afectaría a una eficiente reparación del daño al DNA, la eliminación del complejo LINC debería mostrar un fenotipo similar a la falta de función de *timp* en relación al gen *p53*. *Drosophila* posee una única proteína SUN, llamada Klaroid (Koi) y dos nesprinas, Msp300 de unión a actina y Klarsicht (Kash) de unión a microtúbulos (Kracklauer et al., 2007; Rosenberg-Hasson et al., 1996). En este trabajo, se empleó una condición mutante nula para *koi* mediante la combinación de la delección del gen que alberga el alelo *koi^{HRK080}* con la deficiencia Def(2R)CG3287-*koi* (*koi^{HRK080}*/Def(2R)CG3287-*koi*, en adelante *koi⁻*) Para comprobar si la ausencia del complejo LINC reproducía el comportamiento observado en el fondo doble mutante *timp⁻ p53⁻*, se cuantificó también el número de GSCs en nichos *koi⁻ p53⁺* y *koi⁻ p53⁻* de 1 y 2 semanas, de forma paralela al experimento anterior (Fig. 42; nótese que el control y *w* es el mismo que en Fig. 41).

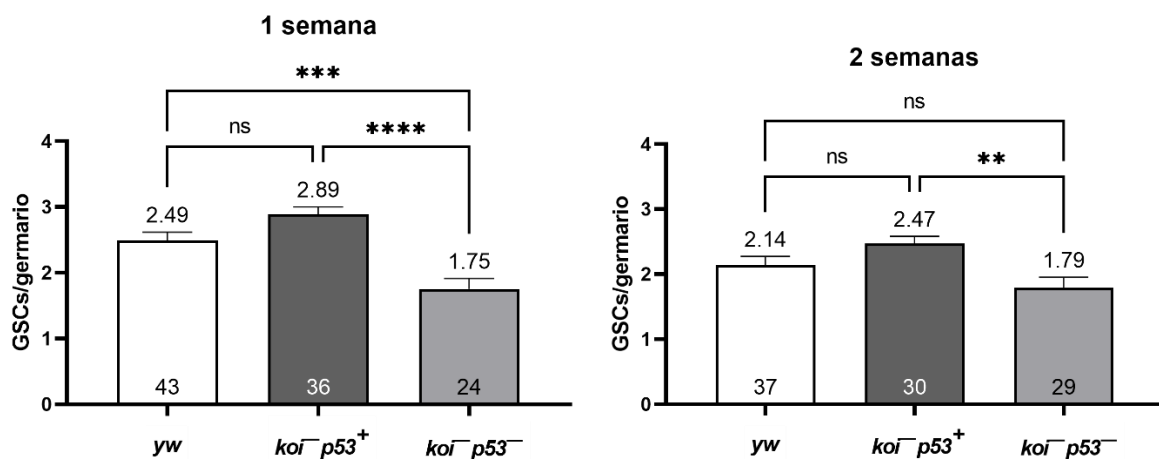


Figura 42. Número de GSCs por germlario y su relación con los genes *koi* y *p53*. Representación de la media aritmética y el error estándar de la media. La n de cada muestra se indica en el interior de las barras. La significancia estadística entre muestras se analizó mediante análisis ANOVA de una vía, seguido de un test múltiple de Tukey (n.s., no significativo; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; *, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

La eliminación de *koi* no afectaba significativamente al número de GSCs por nicho en hembras de 1 y 2 semanas, al igual que se había observado para el mutante *timp*. Sin embargo, la eliminación de *p53* en un fondo mutante *koi* sí disminuye significativamente el número de GSCs en el germario, especialmente en hembras de 1 semana. En definitiva, estos resultados mostraron que la alteración de la conexión cito-nucleoesqueleto no fenocopia la falta de función de *timp*⁻ y apunta a un papel de éste independiente del complejo LINC.

A

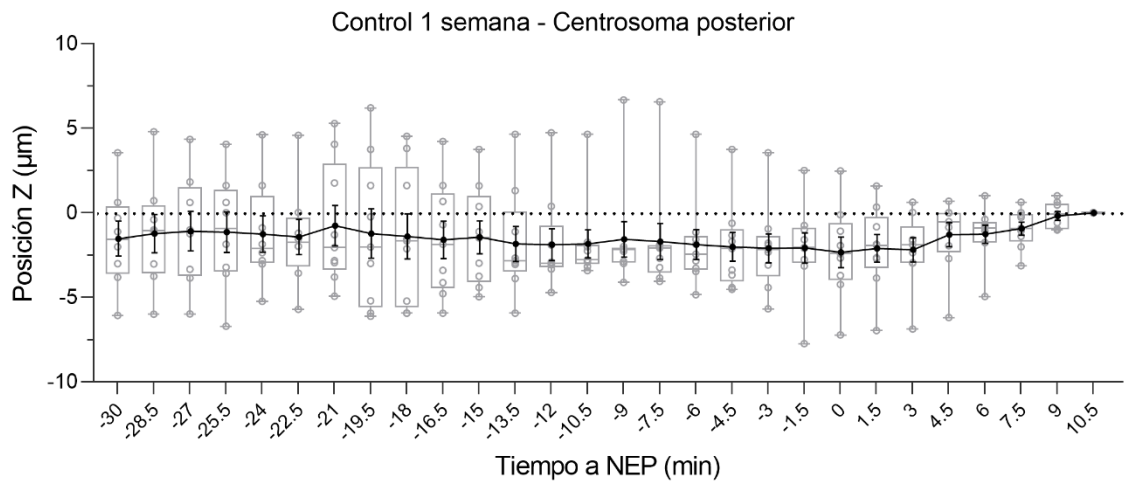
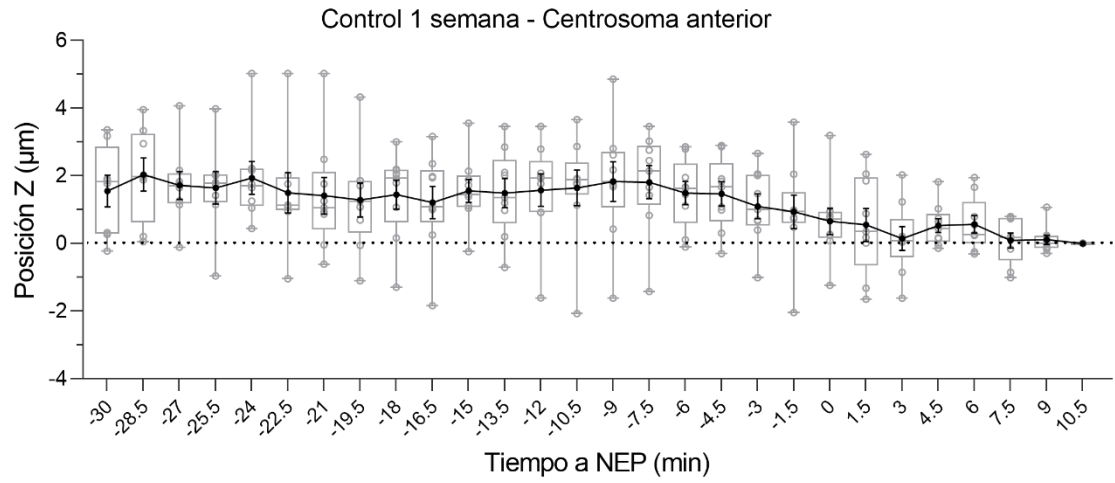


Fig. S1. (Leyenda más adelante)

B

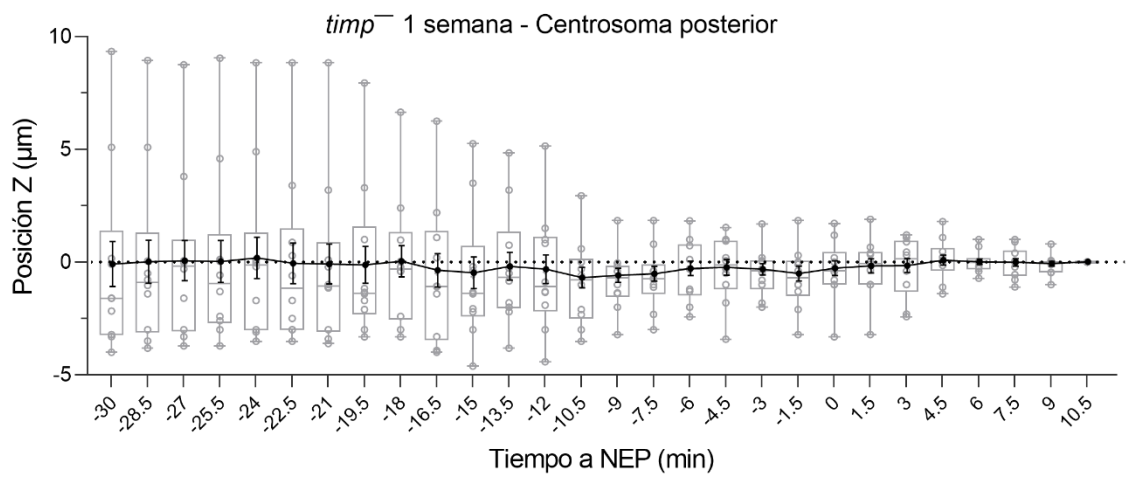
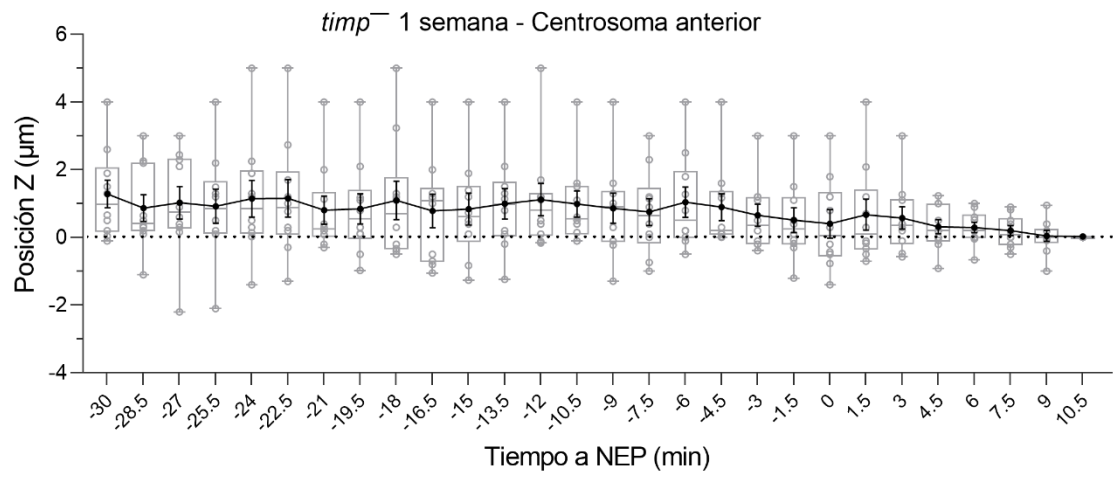


Fig. S1. (Leyenda más adelante)

C

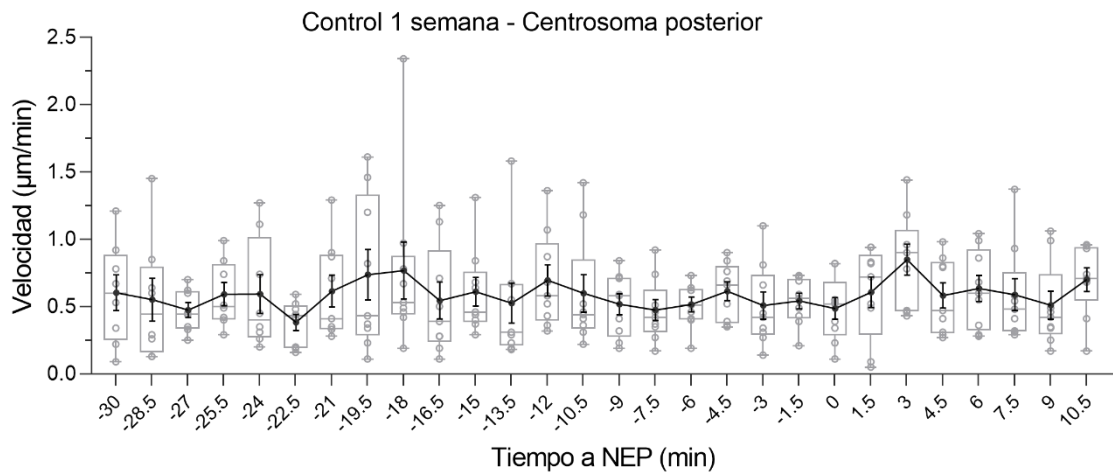
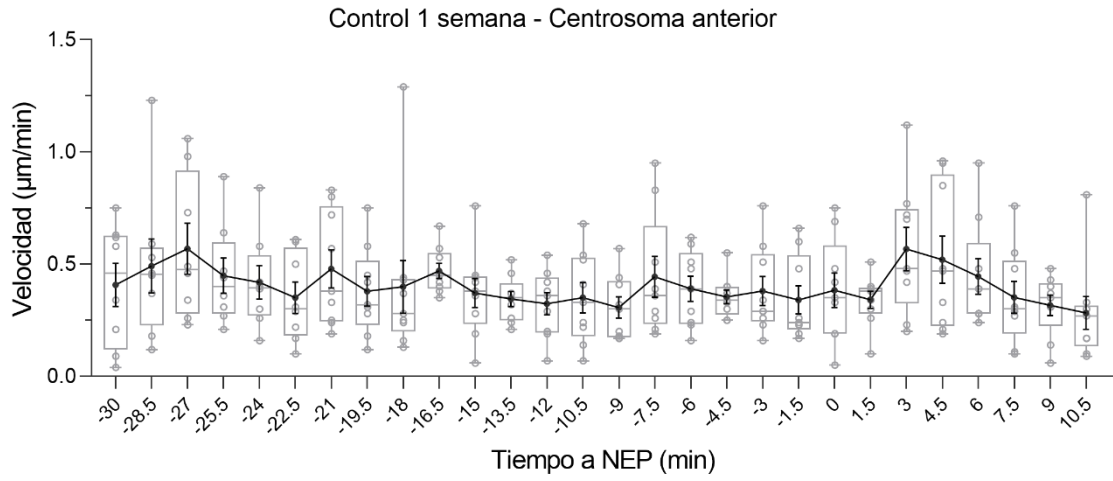


Fig. S1. (Leyenda más adelante)

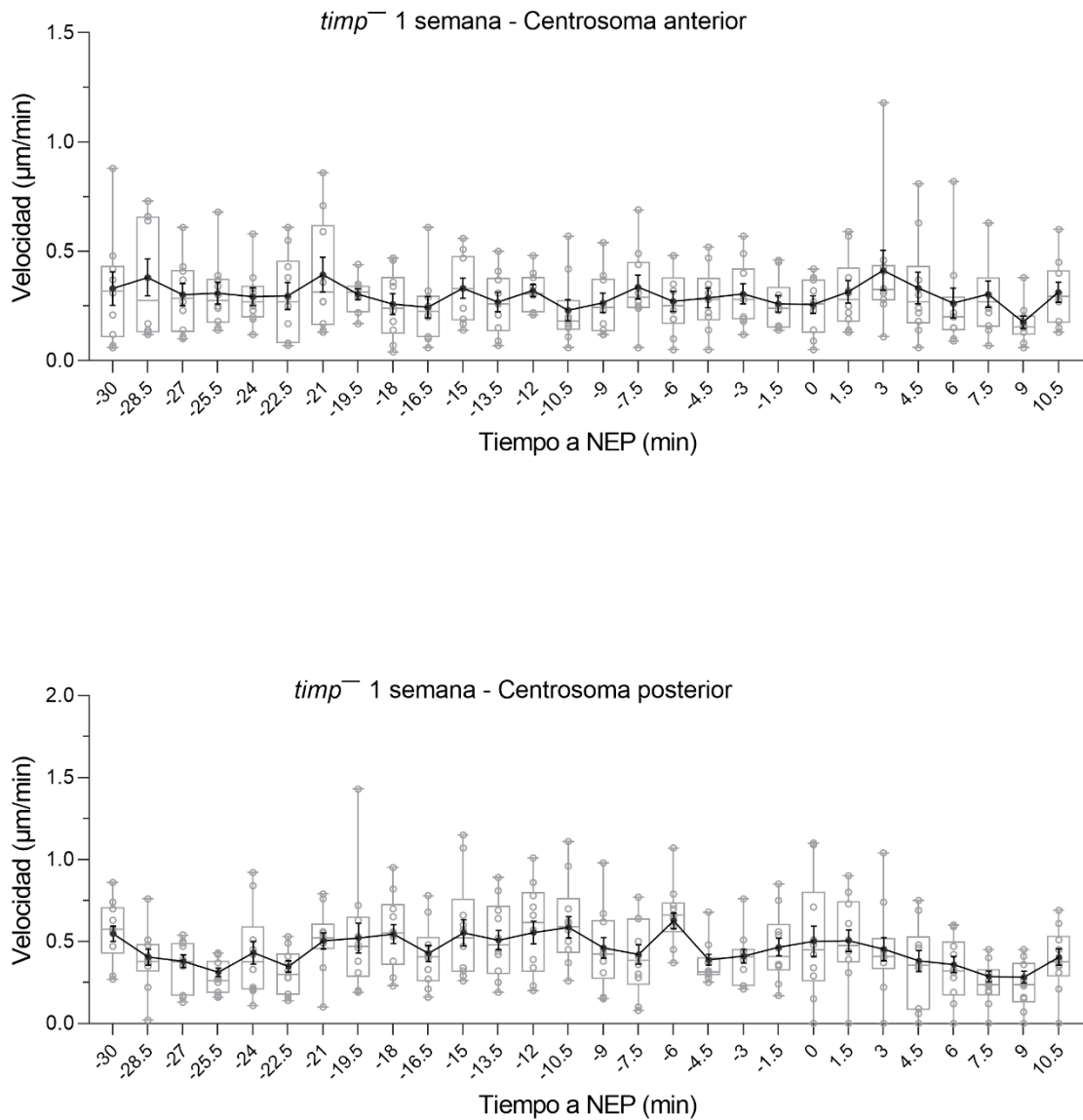
D

Fig. S1. Cuantificaciones de los movimientos de centrosomas de GSCs control (A, C) y *timp*⁻ (B, D) de 1 semana, atendiendo a su posición en Z (A, B) y a su velocidad de desplazamiento (C, D). Los valores individuales de cada medición se representan como círculos grises en los gráficos de cajas y bigotes. La línea oscura y las barras de error representan la media y el error estándar de la media, respectivamente. El número de centrosomas analizados en cada punto de tiempo se indica entre paréntesis. En el gráfico de la posición en Z, la línea 0 indica la posición final de los centrosomas en $t=10.5'$; todas las posiciones del centrosoma anterior en $t=-30'$ se consideraron valores positivos y se utilizaron como referencia para el resto de posiciones de ambos centrosomas.

A

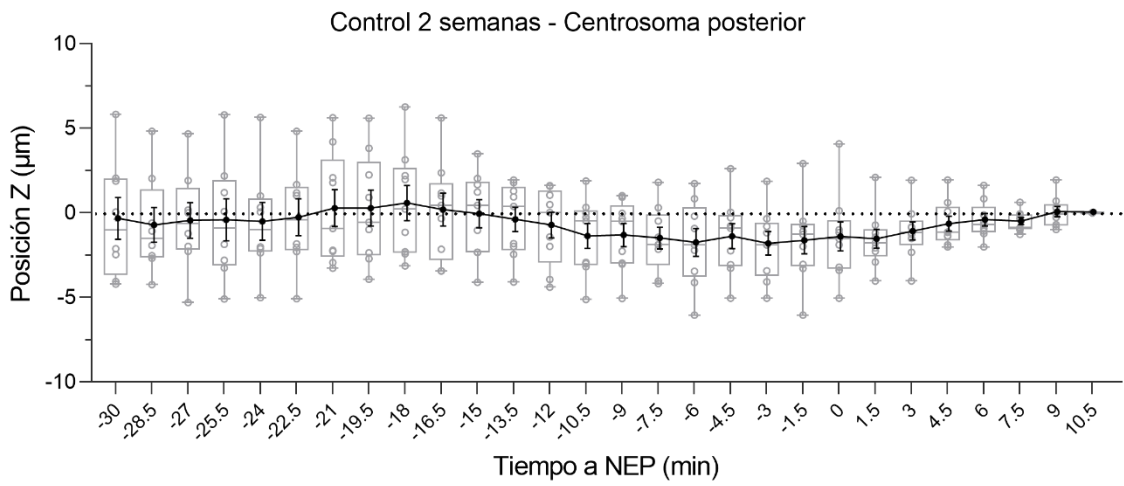
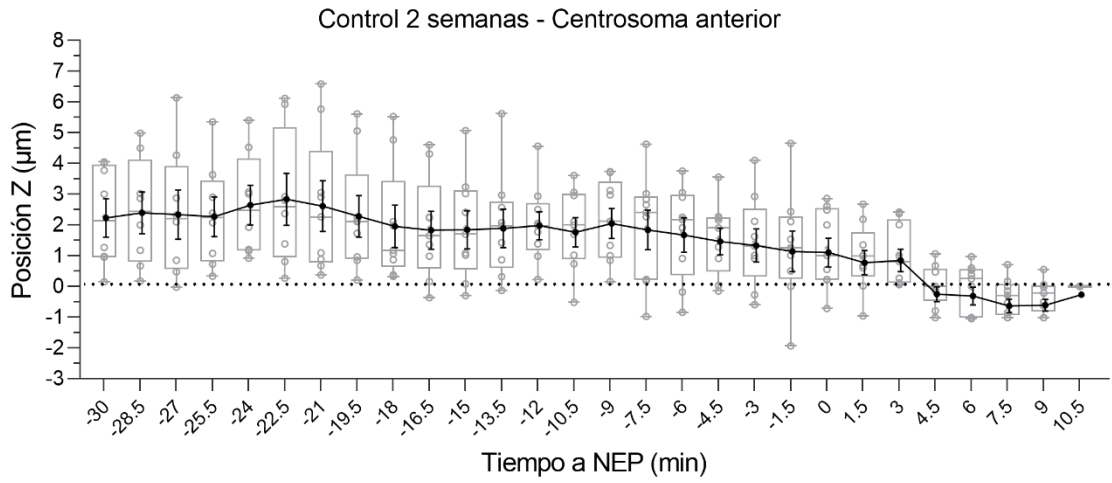


Fig. S2. (Leyenda más adelante)

B

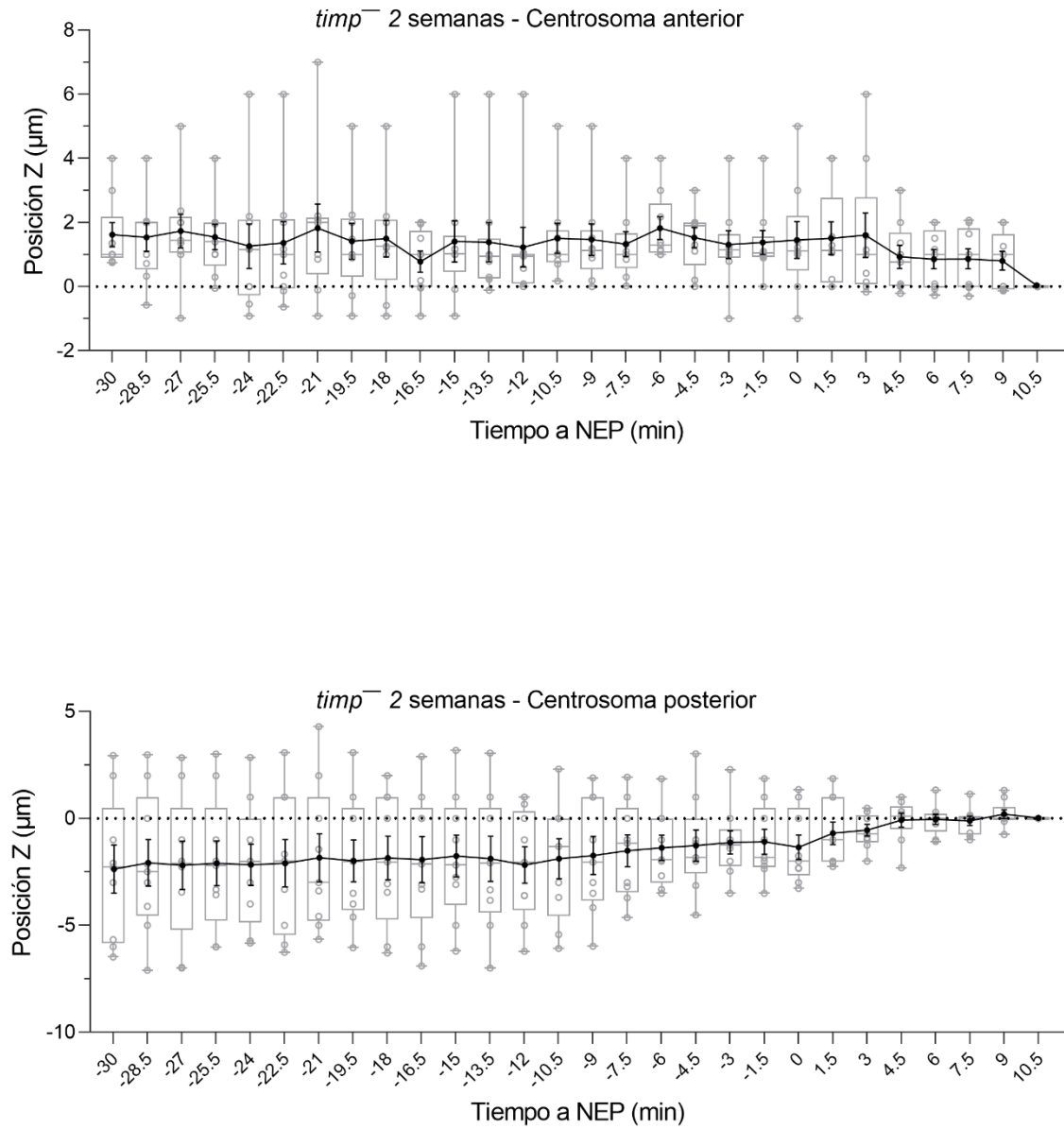


Fig. S2. (Leyenda más adelante)

C

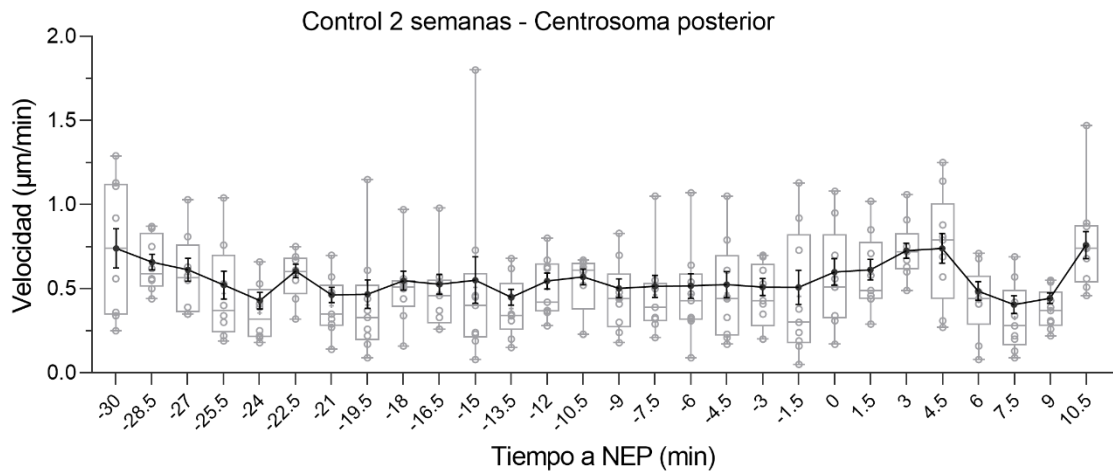
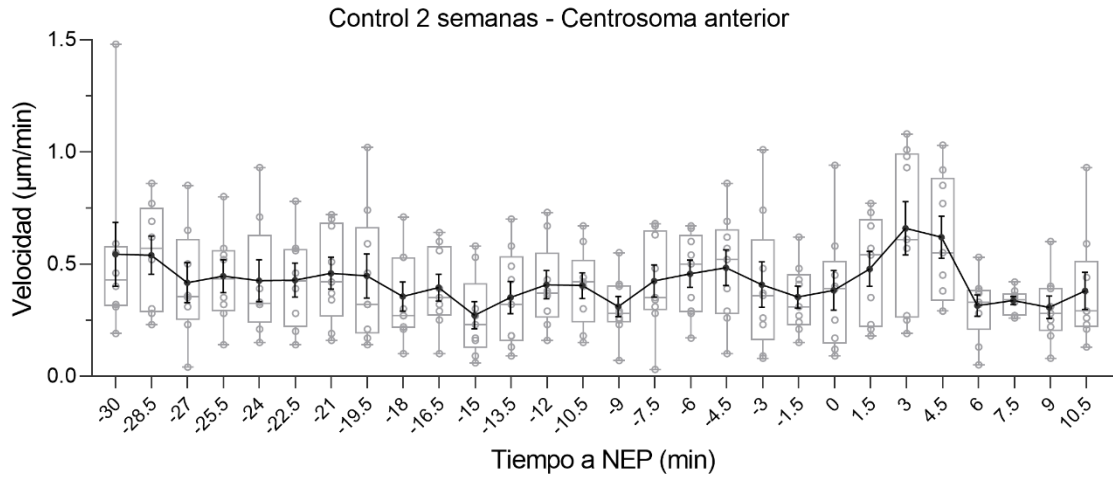


Fig. S2. (Leyenda más adelante)

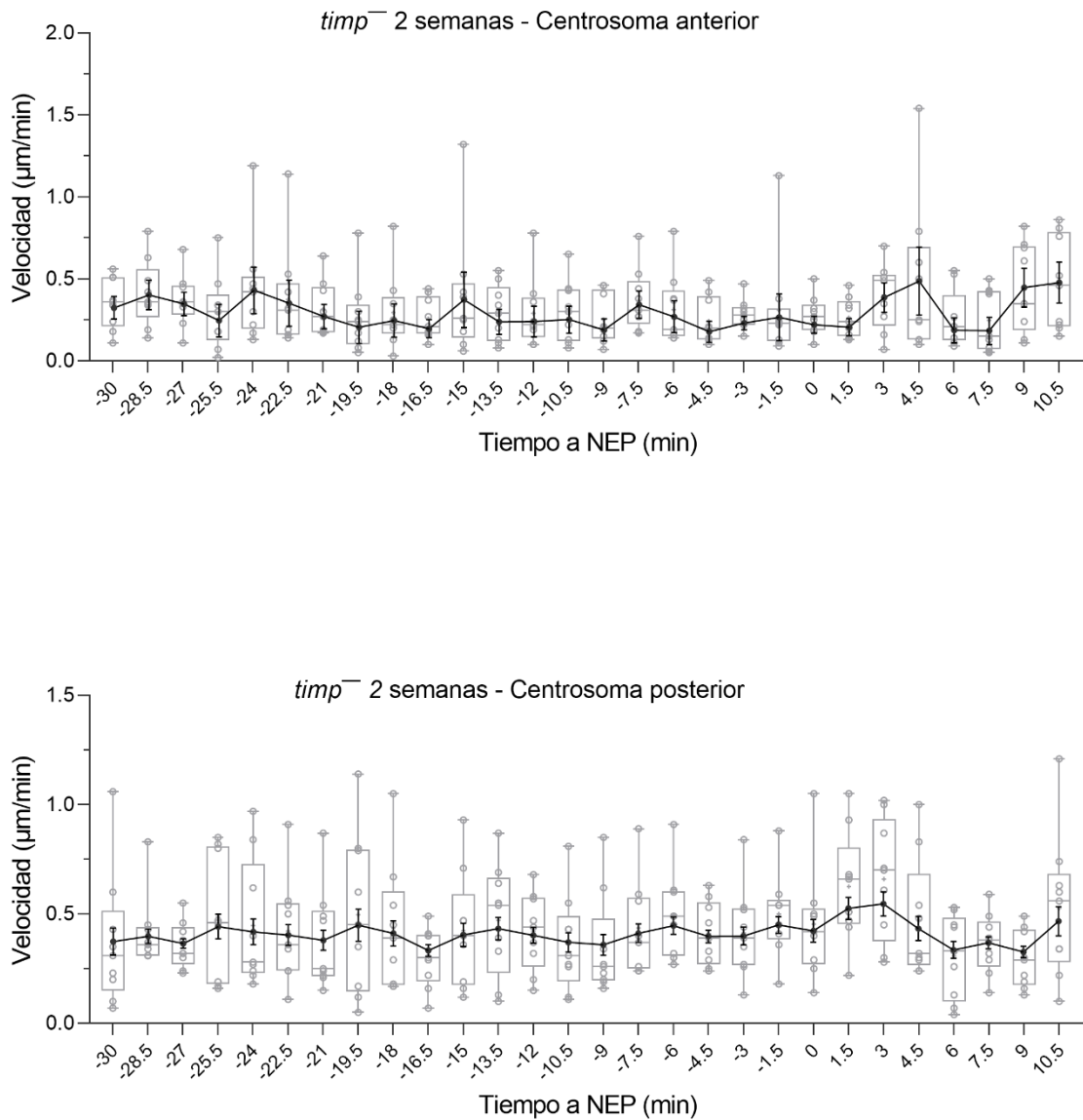
D

Fig. S2. Cuantificaciones de los movimientos de centrosomas de GSCs control (**A, C**) y *timp⁻* (**B, D**) de 2 semanas, atendiendo a su posición en Z (**A, B**) a su velocidad de desplazamiento (**C, D**). Los valores individuales de cada medición se representan como círculos grises en los gráficos de cajas y bigotes. La línea oscura y las barras de error representan la media y el error estándar de la media, respectivamente. El número de centrosomas analizados en cada punto de tiempo se indica entre paréntesis. En el gráfico de la posición en Z, la línea 0 indica la posición final de los centrosomas en $t=10.5'$; todas las posiciones del centrosoma anterior en $t=-30'$ se consideran valores positivos y se utilizaron como referencia para el resto de posiciones de ambos centrosomas.

II.2. DISCUSIÓN

II.2.1. El movimiento del centrosoma como posible reflejo del estado del citoesqueleto

Hemos seguido el desplazamiento que experimentan los centrosomas durante los 30 minutos previos a NEP en las GSCs *timp*⁻ y hemos observado que su comportamiento es menos dinámico que los controles. Esto podría indicar que las características del citoesqueleto de microtúbulos en GSCs *timp*⁻ son distintas a la de GSCs control. En células eucariotas, los centrosomas son los principales centros organizadores de microtúbulos o MTOCs, aunque también pueden encontrarse actividad MTOC en el aparato de Golgi, la envoltura nuclear o la membrana plasmática (Akhmanova & Steinmetz, 2015; Sanchez & Feldman, 2017). En los MTOCs, la formación o nucleación de microtúbulos se define como un proceso de inestabilidad dinámica, ya que hay un equilibrio entre la polimerización y despolimerización que sufren estos filamentos en su extremo en crecimiento. Tan importante como la actividad nucleadora es la función de captura y estabilización de microtúbulos, que pueden haber sido nucleados desde un MTOC diferente, como es el fenómeno de captura de microtúbulos astrales por parte de los centrosomas al posicionarse en los extremos del eje de división (Akhmanova & Steinmetz, 2015; Sanchez & Feldman, 2017).

Teniendo en cuenta que los mutantes *timp* presentan una menor rigidez en la membrana basal que rodea a cada germario, es posible que las GSCs de nichos *timp*⁻ se encuentren en un contexto biofísico diferente a las GSCs control, y que las tensiones a la que estén sometidas dentro del tejido sean menores. Según nuestra hipótesis de trabajo, la diferencia en el comportamiento de los centrosomas reflejaría la existencia de redes de microtúbulos con distintas dinámicas de nucleación y despolimerización en GSCs control y *timp*⁻. En este contexto, recientemente se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* que existe una relación directa entre la viscosidad del citoplasma y la dinámica de los microtúbulos, observándose una menor inestabilidad dinámica a mayor concentración citoplasmática y viceversa (Molines et al., 2022). La confirmación de nuestra hipótesis implicaría analizar de forma directa la dinámica del citoesqueleto de microtúbulos en GSCs mutantes *timp*, por ejemplo, observando *ex vivo* el comportamiento de las proteínas asociadas al extremo en crecimiento de microtúbulos EB1 o Tau (Parton et al., 2011). Asimismo, sería interesante también comprobar las propiedades biofísicas del citoplasma en GSCs control y mutantes.

II.2.2. Relación de la afectación del ciclo y respuesta a daño en DNA en las GSCs *timp*⁻

Hemos observado cómo el ciclo celular de GSCs mutantes *timp* tiene una progresión alterada en la que el conjunto de fases G1+S presenta mayor duración que en las GSCs control. En este análisis no pudimos discernir la duración individual de las fases G1 y S debido a una limitación técnica imprevista de la herramienta Fly-FUCCI (no se detecta señal de ninguno de los marcadores de ciclo celular inmediatamente después de una división (Hinnant et al., 2017; Zielke et al., 2014)). Además, y al contrario que en nuestros análisis de muestra fijada en los que combinamos Fly-FUCCI con la observación de la morfología del espectrosoma, en muestra viva no pudimos aplicar esta doble estrategia. Esto es debido a una serie de factores. Primero, la complejidad que supone la observación conjunta *ex vivo* de marcadores fluorescentes con longitud de onda de emisión muy próximas, como ocurriría con el marcador de ciclo GFP::E2F1 y las proteínas de fusión GFP::Par1 y YFP::Par1. Y segundo, aunque disponíamos de una fusión de Par-1 con la variante fluorescente mCherry, su fluorescencia era muy limitada en el tiempo en las condiciones de nuestras películas. Una posible aproximación futura para distinguir mejor las fases del ciclo en mutantes *timp* consistiría en combinar una versión de la herramienta Fly-FUCCI que incluya un sólo marcador de ciclo con una proteína de fusión Par-1::proteína fluorescente con una longitud de onda de emisión no solapante.

También sería aclaratorio estudiar las ciclinas en *timp*⁻ para corroborar si el diferente progreso de las fases celulares observado coincide con el desequilibrio de alguna de ellas. Por ejemplo, se podrían analizar los niveles y la dinámica de expresión de CycE como marcador de transición G1/S, de las ciclinas mitóticas CycA y CycB, o del homólogo en *Drosophila* de la familia de inhibidores de Cdks, Dacapo (Ables & Drummond-Barbosa, 2013; Wang & Lin, 2005; Xing et al., 2015).

Nuestro análisis de la dinámica de la reparación de DSBs en GSCs mutantes *timp*, utilizando como marcador la fosforilación de la histona γ -H2AV, también ha identificado que éstas acumulan mayor daño a DNA. Así, el incremento de la duración de las fases G1+S en GSCs mutantes podría deberse a que éstas detectan daño en el DNA y disparan un *checkpoint* de integridad de DNA que ralentiza el ciclo hasta que el daño se repare. Como la histona γ -H2AV puede ser fosforilada por ambas kinasas de *checkpoint* ATM y ATR, para profundizar en nuestra hipótesis sería conveniente analizar en experimentos futuros si la falta de función de *grapes* (homólogo de Chk1), *mei-41* (homólogo de ATR), *loki/mnk* (homólogo de Chk2) o *tefu*

(homólogo de ATM) (Abdu et al., 2002; Joyce et al., 2011; Royou et al., 2008) en GSCs mutantes *timp* es capaz de rescatar el fenotipo de alteración del ciclo.

II.2.3. ¿Juega p53 un papel en las GSCs *timp*?

La fosforilación de p53 inducida por Chk1 y/o Chk2 se requiere para la parada del ciclo celular y la reparación del DNA (revisado en Sperka et al., 2012). En las GSCs, se ha demostrado i) que el daño a DNA induce la expresión de p53 (Wylie et al., 2014) y ii) que p53 evita la pérdida de GSCs tras la generación de daño al DNA (Ma et al., 2016). Estos datos confirmarían que p53 tiene una función esencial en la reparación de daño a DNA y en la progresión del ciclo celular en las GSCs. Nuestra observación de que la falta de p53 provoca la pérdida de GSCs en hembras de 1 o 2 semanas apoya esta conclusión.

Sin embargo, la falta de función de p53 en un fondo mutante *timp* no afecta al número de GSCs que habitan el nicho de 1 o 2 semanas. Teniendo en cuenta que las GSCs *timp*⁻ presentan mayor incidencia de daño a DNA (que persiste al menos 2 semanas), este resultado implica i) que la falta de función de *timp* impide que se active el *checkpoint* de daño a DNA y por ello p53 es dispensable, o ii) que el *checkpoint* se active pero que éste sea inefectivo a la hora de reparar los cortes de doble cadena, bien porque p53 no pueda ejercer su función correctamente, bien porque algún otro componente del *checkpoint* sea también no funcional. Como consecuencia, p53 no está activo, los DSBs no son reparados, el ciclo celular progresa y las GSCs se dividen incluso en presencia de daño en el DNA. Esto último podría comprometer la viabilidad de las células hijas que entran en diferenciación, explicando así la disminución en el número de cistos observado en mutantes *timp* a lo largo del tiempo (Pearson et al., 2016).

Habiendo observado un aumento en la duración de la sección del ciclo formada por las fases G1+S, consideramos que la segunda posibilidad (que el *checkpoint* de integridad de DNA se activa pero que no es funcional) es más probable. En este supuesto, podría suceder que en *timp*⁻ se inicia el arresto de fase G1 de forma aguda e independiente de p53, por la degradación de la ciclina CycD, con la consecuente liberación de la subunidad p21 del complejo Cdk4-CycD, acudiendo entonces p21 a inhibir el complejo Cdk2-CycE (Agami & Bernards, 2000; Ekholm & Reed, 2000). Pero, al no funcionar correctamente p53 aguas abajo de la cascada de respuesta de daño a DNA que ha iniciado el arresto, no tiene lugar la síntesis de p21 dependiente de p53 necesaria para mantener el bloqueo de Cdk2-CycE, por lo que el arresto no continúa el tiempo suficiente como para completar la reparación del daño. Este daño se acumularía

progresivamente, a la vez que sería transmitido a la descendencia, la cual carece del bloqueo protector de apoptosis (Bilak et al., 2014; Wylie et al., 2014; Xing et al., 2015) y terminaría siendo eliminada. Para profundizar en esta hipótesis sería necesario analizar los niveles de caspasa en la descendencia de GSCs *timp*⁻, esto es, viendo si, efectivamente, existe un aumento de apoptosis en CB y cistos mutantes. Desconocemos, no obstante, el mecanismo por el cual la activación de p53 estaría afectada en mutantes *timp* y originaría esta respuesta.

II.2.4. La conexión núcleo-citoesqueleto LINC no fenocopia el comportamiento del mutante *timp*: otros factores a considerar

Por último, hemos planteado si la presencia de daño en DNA en el mutante *timp* estaba relacionada con una alteración en la conexión entre núcleo y citoesqueleto, involucrando el papel que se ha descrito para el complejo LINC en la reparación de este daño (revisado en Lambert, 2019). Sin embargo, la eliminación conjunta de la proteína p53 y el complejo LINC provoca la disminución del número de GSCs presentes en el nicho, en claro contraste con los dobles mutantes *p53*⁻ *timp*⁻ (en los que el número de GSCs no se ve afectado), lo que indicaría que la falta de función del complejo LINC no fenocopia a los mutantes *timp*.

La consistencia del medio extracelular no sólo afecta mecánicamente a la célula, es decir, al estado de su citoesqueleto, al movimiento de orgánulos o a la mecanotransducción al núcleo, sino que también debemos considerar otras vías relacionadas, como puede ser la difusión de nutrientes, de factores de crecimiento u otros factores de señalización que afecten al ciclo y, por tanto, al comportamiento celular. Por ejemplo, se ha descrito que GSCs mutantes para el receptor de insulina presentan defectos en la frecuencia de división (LaFever & Drummond-Barbosa, 2005) y que este fenómeno es dependiente de la actividad de Dacapo, encargado de frenar el ciclo mediante la inhibición de CycE (Yu et al., 2009). No podemos descartar que la alteración del ciclo observada en GSCs mutantes *timp* esté relacionada con la regulación de los niveles de Dacapo aguas abajo del receptor de insulina, derivada de una diferente difusión de los ligandos del receptor en un medio extracelular de menor consistencia característico de mutantes *timp*.

Otro importante factor a considerar en el comportamiento observado en las GSCs mutantes *timp* sería la contribución que las diferentes líneas celulares presentes en el germario podrían tener. Las células escolta secretan moléculas de señalización que regulan la progresiva diferenciación de las células germinales, acompañando a éstas a medida que se alejan del nicho.

Esta actividad de las escolta está, a su vez, regulada de forma no autónoma por señalización de Hedgehog, Wnt/Wingless, Epidermal Growth Factor (EGF), insulina y ecdisona. Gran parte de estas vías de señalización afectan a la estructura del citoesqueleto y la dinámica de las protrusiones de las células escolta, que son esenciales en su función de acompañamiento de la línea germinal (revisado en Hinnant et al., 2020). Dado que en esta tesis doctoral sólo se ha trabajado con un mutante ubicuo de *timp*, no se ha podido distinguir si la ausencia de este gen es únicamente relevante en la línea germinal, en la línea somática o en ambas. En futuros experimentos, podría reducirse la expresión de *timp* específicamente en la línea germinal (utilizando *nanos-Gal4* y *UAS-timp RNAi*; (Perkins et al., 2015)) o en las células escolta (con *patched-Gal4*) y analizar su efecto en el comportamiento de las GSCs. Igualmente, sería interesante intentar fenocopiar un contexto de menor rigidez de la membrana basal mediante expresión dirigida de RNAis contra componentes de esta matriz extracelular especializada, como pueden ser colágeno tipo IV o laminina.

CONCLUSIONES

1. La dinámica de la morfología del espectrosoma de las GSCs de la hembra de *Drosophila* a lo largo del ciclo celular confirma la división asimétrica de las GSCs. Mediante observación *ex vivo* se describe la siguiente progresión: “round-G1”, “plug”, “bar”, “fusing”, “exclamation point” y “round-G2”.
2. En las condiciones experimentales definidas en este trabajo de tesis, el ciclo de las GSCs de la hembra de *Drosophila* tiene una duración total media de ~15 horas, con la siguiente distribución de las fases: G1, 22% del ciclo (3 horas), S fase, 8% (1 hora) y G2/M, 70% (11 horas). De interés, la duración de cada morfología del espectrosoma presenta una gran variabilidad, incluso entre GSCs pertenecientes al mismo germario (exceptuando la fase “round-G1”).
3. Existe un tráfico de material espectrosómico, tanto en GSCs como en CB, que contribuye al crecimiento y cambio morfológico de ciclo del espectrosoma. Además, la GSC hereda el MB post-abscisión.
4. La kinasa Par-1 se libera del espectrosoma (y luego del fusoma) durante la mitosis de las GSCs de la hembra, al igual que ocurre en el macho de *Drosophila*.
5. En los instantes previos a la división, el centrosoma que heredará el CB muestra un comportamiento más dinámico que el que permanecerá en la GSC. Los centriolos de las GSCs se separan temprano en fase G1, antes de que ocurra su duplicación en fase S.
6. Los tumores de GSCs de la hembra de *Drosophila* se dividen de forma simétrica, repartiendo el material espectrosómico por igual entre ambas células hijas, lo que enfatiza la influencia del nicho en el comportamiento asimétrico de las GSCs.
7. La duración del proceso de división celular en las GSCs de la hembra de *Drosophila* no se ve afectada en un fondo mutante *timp*. Sin embargo, la progresión del ciclo en mutantes *timp* está alterada, mostrando una mayor duración de las fases G1/S.

8. Los centrosomas anterior y posterior de GSCs mutantes *timp* se desplazan con menor velocidad durante al menos los 30 minutos previos a la NEP. Este menor dinamismo podría reflejar un diferente comportamiento del citoesqueleto de microtúbulos.
9. Nichos mutantes *timp* envejecidos muestran un mayor número de GSCs con cortes de doble cadena, lo que es indicativo de una deficiente reparación de este tipo de daño en el DNA. Además, a diferencia de germarios control, el mantenimiento del número de GSCs en germarios mutantes *timp* es independiente de la actividad protectora de p53.
10. En ausencia de p53, la eliminación de la conexión nucleoesqueleto-citoesqueleto que media el complejo LINC no fenocopia la falta de función de *timp* en cuanto al mantenimiento de GSCs. Esto apunta a un papel de *timp* en el nicho independiente del complejo LINC.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Genética

1.1 Líneas de *Drosophila melanogaster*

Las moscas empleadas en este trabajo crecieron en medio estándar, mantenidas a 25°C. A continuación, se especifican el genotipo y la procedencia de las líneas originales empleadas.

Genotipo	Procedencia
<i>w; nanos-Gal4</i>	Bloomington Drosophila Stock Centre (BDSC) 4442
<i>w;; pUbi-GFP::par-1</i>	P. Rojas-Ríos (Villa-Fombuena et al., 2021)
<i>w; UASp-GFP:E2F1, UASp-mRFP1:NLS-CycB/CyO, wg-lacZ</i>	BDSC 55110
<i>w, pUbi-YFP::asl</i>	Rebollo et al., 2007
<i>w, pUbi- GFP::αtubulin 84B</i>	Rebollo et al., 2004
<i>w; His2AV::mRFP1</i>	BDSC 25377
<i>w; pUbi-YFP::cnb/CyO</i>	Januschke et al., 2011
<i>w;; pUbi-EB1::GFP/TM6B</i>	Shimada et al., 2006
<i>w;; UASp-Tkv^{A^{ct}}/TM3</i>	Casanueva et al., 2004
<i>y w</i>	BDSC 6598
<i>w;; timp²⁸/TM3</i>	A. Page-McCaw
<i>w;; Df(3R)ED5472/TM6c</i>	BDSC 9081
<i>w, pUbi-YFP::par-1</i>	F. Zurita
<i>y w;; p53^{5A-1-4}</i>	BDSC 6815
<i>y w;; p53^{11-1B-1}</i>	BDSC 6816
<i>y w; Df(2R)koi^{HRK080}/CyO, Ras</i>	J-A. Lepesant (cedido por A. Guichet)
<i>y w; Df(2R)CG3287-koi /CyO, Ras</i>	J-A. Lepesant (cedido por A. Guichet)

En el desarrollo de esta tesis, se generaron las siguientes líneas a partir de cruces de las anteriormente listadas.

w, pUbi-YFP::asl, pUbi-GFP::atubulin 84B; His2AV::mRFP1

w; pUbi-YFP::cnb/CyO; pUbi-EB1::GFP/TM6B

w; His2AV::mRFP1; timp²⁸/TM6B

w, pUbi-YFP::asl, pUbi-GFP::atubulin 84B; Df(3R)ED5472/TM2

w; nanos-Gal4/CyO; Df(3R)ED5472/TM2

w; UASp-GFP:E2F1, UASp-mRFP1:NLS-CycB/CyO; timp²⁸/TM6B

w, pUbi-YFP::par-1/FMZ;; Df(3R)ED5472/TM2

w, pUbi-YFP::par-1/FMZ;; timp²⁸/TM6B

y w;; p53^{5A-1-4}, timp²⁸/TM6c

w;; p53^{11-1B-1}, Df(3R)ED5472/TM6B

w; Df(2R)CG3287-koi /CyO; p53^{11-1B-1}/TM2

w; Df(2R)koi^{HRK080}/CyO; p53^{5A-1-4}/TM2

1.2. Sistema GAL4/UAS en *Drosophila*

El sistema GAL4/UAS es una herramienta genética que permite controlar a nivel espacial y temporal la expresión de secuencias ectópicas en *Drosophila* (Brand et al., 1993). Basada en secuencias procedentes de levaduras, la herramienta consta de dos elementos: un factor de transcripción GAL4 y una secuencia UAS (del inglés *upstream activation sequence*). El factor GAL4 reconoce y se une a la secuencia UAS, activando la transcripción de aquello que se encuentre aguas abajo de dicha secuencia (Fig. Mat_FigA1). De esta manera, si una línea transgénica de *Drosophila* posee la secuencia GAL4 bajo un promotor específico de tejido o tipo celular “A”, y otra línea posee una secuencia de interés “B” bajo UAS, la descendencia de estas líneas parentales expresará la secuencia de interés “B” sólo en aquellas células en las que se exprese el promotor “A” que dirige la expresión del factor GAL4 (Fig. Mat_FigA1). El rango fisiológico para experimentos con *Drosophila* se encuentra entre 18°C y 29°C, siendo la actividad GAL4 mayor conforme aumenta la temperatura (Duffy, 2002). En este trabajo de tesis todos los experimentos se han llevado a cabo a 25°C.

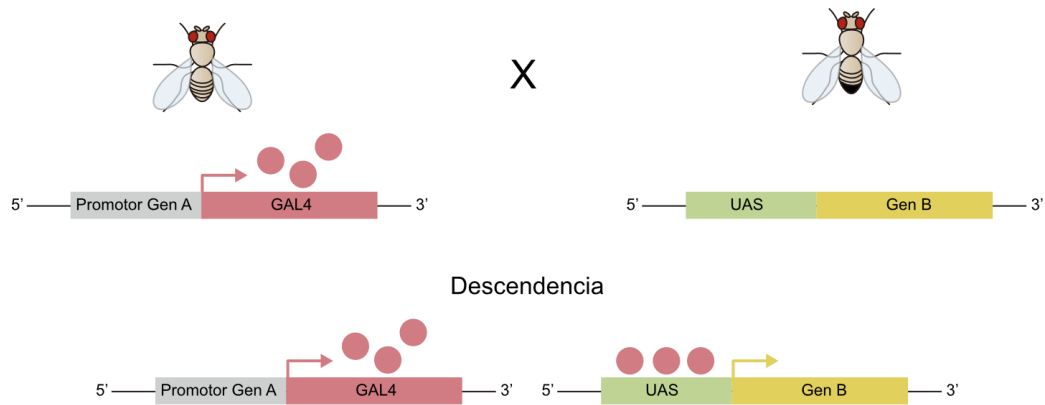


Figura Mat_FigA1. Esquema del sistema GAL4/UAS de *Drosophila*.

1.3 Regulación de la expresión génica

En esta tesis doctoral, se han utilizado líneas de expresión ubicua, líneas de expresión dirigida basada en el sistema GAL4/UAS y líneas resultantes de la combinación de ambas.

En el experimento de generación de tumores de GSCs, se utilizaron zonas reguladoras del gen *nanos* para dirigir la expresión de la forma activada del receptor Tkv (*UASp-Tkv^{Act}*) en las células germinales del ovario de *Drosophila*, combinado con la expresión ubicua de GFP::Par-1 (*w; nanos-Gal4/+; UASp-Tkv^{Act}/pUbi-GFP::par-1*).

En los experimentos que emplean los marcadores de ciclo celular Fly-FUCCI, se utilizó igualmente la línea *nanos-Gal4* para dirigir la expresión de *UASp-GFP:E2F1* y *UASp-mRFP1:NLS-CycB*.

Para generar las condiciones mutantes nulas para *timp*, *p53* y *koi*, se combinaron alelos diferentes como se detalla a continuación. La condición nula de *timp* se establece empleando el alelo *timp²⁸*, que alberga la deleción completa del gen *timp*, junto con la deficiencia Df(3R)ED5472 (*timp²⁸/Df(3R)ED5472*). La condición nula de *p53* se establece empleando el alelo *p53^{5A-1-4}*, que alberga la deleción del gen, junto con el alelo *p53^{11-1B-1}*, que provoca un codón de parada prematuro (*p53^{5A-1-4}/p53^{11-1B-1}*). La condición nula de *koi* se establece mediante la combinación de la deleción del gen *koi^{HRK080}* con la deficiencia Df(2R)CG3287-*koi* (*koi^{HRK080}/Df(2R)CG3287-koi*).

Los promotores *pUbi* y *His2AV* son de carácter ubicuo y se utilizaron para expresar proteínas fluorescentes que se localizaban en distintas estructuras u orgánulos de las células.

1.4 Envejecimiento

Para obtener individuos de las edades indicadas en cada experimento, se descartan todos los adultos del vial de interés y posteriormente se recogen aquellos que eclosionan de las pupas en las siguientes 24 horas. Estos adultos se apartan en un nuevo vial y se mantienen durante 1 o 2 semanas a 25°C; la edad de las moscas corresponderá a un rango de 7-8 días y 14-15 días. Durante el tiempo correspondiente al envejecimiento, se traspasan estos adultos a viales con nueva papilla y levadura seca cada 2 días; estas condiciones mantienen a los adultos bien hidratados y nutridos, y estimulan la producción de huevos en las hembras.

2. Microscopía

2.1. Cultivo ex vivo de germarios de *Drosophila*

Se emplearon dos estrategias de cultivo ex vivo diferentes, en función de la duración necesaria para la observación de la muestra. Todos los pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Observación corta del cultivo ex vivo (hasta 2 horas)

Se aplica el protocolo descrito en Valencia-Expósito et al., 2016 con las siguientes modificaciones. Los ovarios se diseccionan en medio Schneider (Biowest, L0207-500) suplementado con 15% de suero fetal bovino (Gibco, 10500-064; S-FBS), 0.6% de mezcla de antibióticos estreptomicina/penicilina (Invitrogen, 15140-122) y 0.20 mg/ml de insulina (Sigma-Aldrich, 15500). Se utiliza un pequeño volumen de medio Schneider (1-2 μ l) para transferir ovariolas sin capa de músculo a una placa de 35 mm con fondo de cristal recubierto con poli-D-lisina (MatTek, P35GC-1.5-10-C) y en el centro de la cual se había adherido con silicona un anillo de plástico. Una vez depositadas la ovariolas dentro del anillo de plástico, se añaden 100 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (2% en medio Schneider) al interior del anillo y, una vez solidificada ésta, la placa se llena con medio Schneider hasta sobrepasar por completo la altura del anillo (Fig. Mat_FigA2)

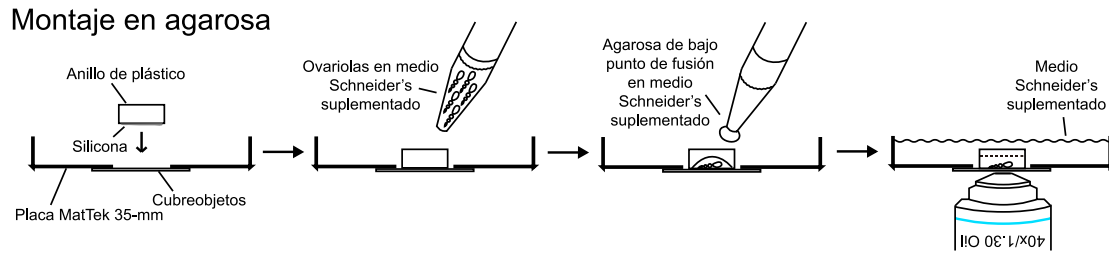


Figura Mat_FigA2. Esquema de los pasos de montaje de ovariolas en agarosa para *ex vivo*.

Observación larga del cultivo *ex vivo* (hasta 10-16 horas)

Antes de comenzar la disección de ovarios, se prepara una placa de 35 mm con poli-D-lisina de la siguiente manera. Se añade en el centro de la placa una gota de 3 μ l de pegamento biológico Cell-Tak (Corning 354240), sin extenderla manualmente; se mezcla cuidadosamente un volumen igual de 0.1 M NaCOH_3 (pH 8) en dicha gota y se deja evaporar completamente a temperatura ambiente o, alternativamente, a 4°C durante toda la noche. Los ovarios se diseccionan en medio Ringer [128 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 4 mM MgCl_2 , 35.5 mM sucrose, 5 mM HEPES (pH 6.9)], se extraen ovariolas de su funda de músculo liso y se transfieren en 1-2 μ l de Ringer a la placa previamente preparada con Cell-Tak. Una vez sobre la placa, las ovariolas se colocan en contacto con la superficie de pegamento, utilizando una aguja de disección para empujarlas hacia esta zona, con cuidado de no dañar los germarios. Una vez dispuesta toda la muestra, se añade medio Schneider hasta cubrir la mitad de profundidad de la placa (Fig. Mat_FigA3).

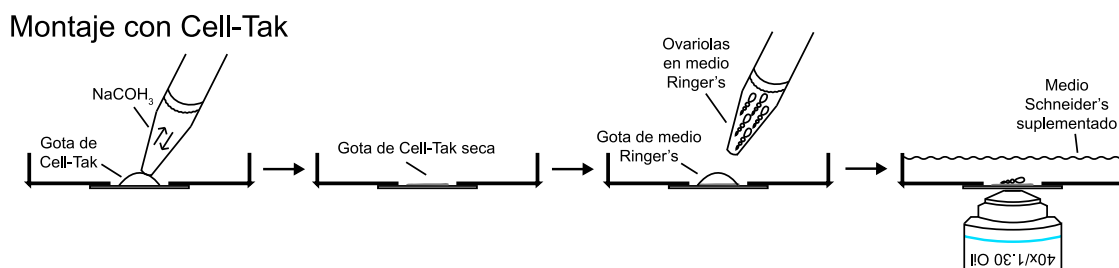


Figura Mat_FigA3. Esquema de los pasos de montaje de ovariolas con Cell-Tak para *ex vivo*.

2.2. Microscopía de muestra viva

Se utilizó un microscopio confocal Leica SP5 para adquirir z-stacks cada 1.2 μm , y puntos de tiempo cada 1.5 o 10 minutos, según el experimento, con un objetivo 40 \times /1.3 NA de inmersión de aceite. Las imágenes fueron analizadas con los softwares Imaris (RRID:SCR_007370) y Fiji (Schindelin et al., 2012) y procesadas con Adobe Photoshop y Adobe Illustrator.

2.3. Tinciones inmunohistoquímicas

Todos los pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y manteniendo la muestra en rotación. La disección se realizó en medio PBT (phosphate buffered saline + 0.1% Tween 20). Los ovarios extraídos fueron fijados con paraformaldehído 4% en PBT durante 20 minutos, lavados en PBT por 20 minutos y bloqueados en BSA 10% (bovine serum albumin) en PBT durante 1 hora. La incubación con anticuerpos primarios se llevó a cabo durante toda la noche, seguida de tres lavados con PBT, de 10 minutos cada uno. La incubación con anticuerpos secundarios se realizó durante 4 horas. Para la tinción de DNA, se incubó con Hoechst (Sigma-Aldrich, 5 mg/ml; 1:1000 in PBT) durante 10 minutos.

Los anticuerpos utilizados, su concentración y procedencia se especifican a continuación.

Anticuerpos primarios	Concentración	Procedencia
Ratón anti-Hts	1:100	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), 1B1
Ratón anti-LaminC	1:30	DSHB, LC28.26
Ratón anti- γ H2Av	1:1000	DSHB, UNC93-5.2.1
Llama conjugado anti-GFP-488	1:200	Chromotek, gba488

Anticuerpos secundarios	Concentración	Procedencia
Burro anti-IgG de ratón (Cy3)	1:100	Jackson ImmunoResearch, AB_2340813
Burro anti-IgG de ratón (Cy5)	1:100	Jackson ImmunoResearch, AB_2340820
Burro anti-IgG de ratón (Cy2)	1:100	Jackson ImmunoResearch, AB_2340827

Otros marcadores histoquímicos	Concentración	Procedencia
Rhodamine-Phalloidin (marcaje de actina)	1:20	Biotium
Hoechst (marcaje de DNA)	1:1000	Sigma-Aldrich

2.4. Microscopía de muestra fijada

Se utilizó un microscopio confocal Leica SP5 para adquirir z-stacks cada 0.7 μm , con un objetivo 63 \times /1.4 NA de inmersión de aceite. Las imágenes fueron analizadas con los softwares Imaris (RRID:SCR_007370) y Fiji (Schindelin et al., 2012) y procesadas con Adobe Photoshop y Adobe Illustrator.

3. Análisis de datos

3.1. Análisis de la morfología del espectrosoma

Las diferentes morfologías del espectrosoma mencionadas en este trabajo se identificaron de acuerdo con descripciones previas (de Cuevas et al., 1998; LaFever et al., 2010). Las características empleadas para reconocer cada una de las cinco morfologías se detallan a continuación:

- Round: Esfera única, en contacto con la roseta de CpCs, por tanto, en posición anterior.
- Plug: Esfera anterior y material en forma de disco que rellena la conexión intercelular GSC-CB.
- Bar: El material de la zona intercelular comienza a crecer de tamaño y se vuelve ovoide.
- Fusing: Forma resultante de la fusión entre el material anterior y el material intercelular en crecimiento.
- Exclamation point: El espectrosoma comienza a estrangularse en la conexión GSC-CB, como consecuencia de la citocinesis, y su forma se retrae para convertirse en “round”.

3.2. Seguimiento del movimiento de centrosomas

El seguimiento del movimiento de centrosomas se realizó con el software de análisis de imagen Imaris (RRID:SCR_007370) empleando la herramienta “Spot tracking”, capaz de modelizar la trayectoria de un cuerpo en una sucesión de imágenes. Para identificar los centrosomas como cuerpo a seguir, se utilizó como referencia el canal correspondiente a la señal YFP::Asl. Se obtuvieron los datos correspondientes a velocidad y posición en el eje Z de cada trayectoria. Para normalizar las coordenadas que el software Imaris asigna a cada posición de la trayectoria, se utilizaron dos referencias. La primera de ellas consistía en considerar que la posición de los centrosomas en la placa metafásica define $z=0$. Esto es, en cada trayectoria, a todas las posiciones que forman dicha trayectoria se les substraen el valor de la posición final, que corresponde a la placa metafásica y se convierte así en $z=0$. En segundo lugar y respecto al valor positivo o negativo del resto de posiciones con respecto a este valor $z=0$ (es decir, posición por encima o por debajo de la placa metafásica), se normalizan considerando que la posición inicial del centrosoma anterior será siempre positiva, tanto para el centrosoma anterior como para el posterior. Los parámetros empleados en el análisis del software Imaris y el planteamiento de la normalización de los datos se definieron con el apoyo del graduado en Física Fernando Ruiz Marín, colaborador gracias al Programa de Garantía Juvenil 2017 del Ministerio de Trabajo.

3.3. Cuantificación de intensidad de fluorescencia

Señal GFP::Par1

Se definieron ROIs en la zona del espectrosoma y en la zona del núcleo para los cinco puntos de tiempo anteriores y posteriores a NEP (-50' a 50'). Para cada ROI, se obtuvo el valor de intensidad media del canal GFP. Los valores correspondientes al punto de tiempo -50' se consideraron el 100% de intensidad de señal y se utilizaron como referencia para el resto de valores recogidos en los sucesivos puntos de tiempo.

Señal Fly-FUCCI

Para cada GSC, se cuantificó la señal endógena de los marcadores Fly-FUCCI seleccionando el plano z que contenía la sección de núcleo de mayor diámetro. La sección se delimitó

manualmente utilizando como referencia el canal de señal Hoechst, y se obtuvieron los valores de intensidad media para el canal GFP (correspondiente a E2F1) y RFP (correspondiente a CycB). A cada una de estas señales se le substrajo la señal de fondo. Para todas las mediciones, se estableció un valor umbral general para clasificar cada GSC como positiva o negativa para cada marcador Fly-FUCCI.

Señal de γ H2Av

Para cada GSC, se cuantificó la señal del canal correspondiente al marcador γ H2Av, seleccionando el plano z que contenía la sección de núcleo de mayor diámetro. La sección se delimitó manualmente utilizando como referencia el canal de señal Hoechst y se obtuvieron los valores de intensidad media de la señal. A cada medida se le substrajo la señal de fondo y se estableció un valor umbral general para clasificar cada GSC como positiva o negativa para el marcador γ H2Av.

3.4. Análisis estadístico

Los experimentos se llevaron a cabo, al menos, por duplicado, cada uno de ellos con un mínimo de 20 réplicas biológicas, siendo la unidad de estudio un germario. Cada muestra se obtuvo de al menos 5 hembras diferentes mantenidas en iguales condiciones ambientales. El tamaño de la muestra corresponde al número de GSCs analizadas o al número de eventos cuantificados. Los valores mostrados corresponden a media aritmética, acompañada del error estándar de la media. En las gráficas de cajas y bigotes, la caja comprende el primer y tercer cuartil, el bigote superior se extiende desde el tercer cuartil hasta el valor más alto, y el bigote inferior se extiende desde el primer cuartil hasta el valor más bajo. El análisis estadístico utilizado para determinar si existen diferencias significativas entre muestras control y experimental corresponde a prueba t de Student, test exacto de Fisher, ANOVA o chi cuadrado, según corresponda y así esté especificado en cada experimento.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdu, U., Brodsky, M., & Schüpbach, T. (2002). Activation of a Meiotic Checkpoint during *Drosophila* Oogenesis Regulates the Translation of Gurken through Chk2/Mnk. *Current Biology*, 12(19), 1645–1651. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01165-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01165-X)
- Ables, E. T., & Drummond-Barbosa, D. (2013). Cyclin E controls *Drosophila* female germline stem cell maintenance independently of its role in proliferation by modulating responsiveness to niche signals. *Development*, 140(3), 530–540. <https://doi.org/10.1242/dev.088583>
- Agami, R., & Bernards, R. (2000). Distinct Initiation and Maintenance Mechanisms Cooperate to Induce G1 Cell Cycle Arrest in Response to DNA Damage. *Cell*, 102(1), 55–66. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00010-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00010-6)
- Akhmanova, A., & Steinmetz, M. O. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(12), 711–726. <https://doi.org/10.1038/nrm4084>
- Arpino, V., Brock, M., & Gill, S. E. (2015). The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biology*, 44–46, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.03.005>
- Bilak, A., Uyetake, L., & Su, T. T. (2014). Dying Cells Protect Survivors from Radiation-Induced Cell Death in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, 10(3), e1004220. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004220>
- Bogard, N., Lan, L., Xu, J., & Cohen, R. S. (2007). Rab11 maintains connections between germline stem cells and niche cells in the *Drosophila* ovary. *Development*, 134(19), 3413–3418. <https://doi.org/10.1242/dev.008466>
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2), 401–415. <https://doi.org/10.1242/dev.118.2.401>
- Bunt, S., Hooley, C., Hu, N., Scahill, C., Weavers, H., & Skaer, H. (2010). Hemocyte-Secreted Type IV Collagen Enhances BMP Signaling to Guide Renal Tubule Morphogenesis in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 19(2), 296–306. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.07.019>
- Casanueva, M. O., & Ferguson, E. L. (2004). Germline stem cell number in the *Drosophila* ovary is regulated by redundant mechanisms that control Dpp signaling. *Development*, 131(9). <https://doi.org/10.1242/dev.01076>
- Chapman, J. R., Taylor, M. R. G., & Boulton, S. J. (2012). Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular Cell*, 47(4), 497–510. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.029>
- Conduit, P. T., & Raff, J. W. (2010). Cnn Dynamics Drive Centrosome Size Asymmetry to Ensure Daughter Centriole Retention in *Drosophila* Neuroblasts. *Current Biology*, 20(24), 2187–2192. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.11.055>

- Coronado, D., Godet, M., Bourillot, P.-Y., Tapponnier, Y., Bernat, A., Petit, M., Afanassieff, M., Markossian, S., Malashicheva, A., Iacone, R., Anastassiadis, K., & Savatier, P. (2013). A short G1 phase is an intrinsic determinant of naïve embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Research*, 10(1), 118–131. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.10.004>
- Cox, D. N., Lu, B., Sun, T.-Q., Williams, L. T., & Jan, Y. N. (2001). *Drosophila* par-1 is required for oocyte differentiation and microtubule organization. *Current Biology*, 11(2), 75–87. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00027-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00027-6)
- de Cuevas, M., Lee, J. K., & Spradling, A. C. (1996). alpha-spectrin is required for germline cell division and differentiation in the *Drosophila* ovary. *Development*, 122(12), 3959–3968. <https://doi.org/10.1242/dev.122.12.3959>
- de Cuevas, M., & Spradling, A. C. (1998). Morphogenesis of the *Drosophila* fusome and its implications for oocyte specification. *Development*, 125(15). <https://doi.org/10.1242/dev.125.15.2781>
- Deng, W., & Lin, H. (1997a). Spectrosomes and Fusomes Anchor Mitotic Spindles during Asymmetric Germ Cell Divisions and Facilitate the Formation of a Polarized Microtubule Array for Oocyte Specification in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 189(1), 79–94. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8669>
- Deng, W., & Lin, H. (1997b). Spectrosomes and Fusomes Anchor Mitotic Spindles during Asymmetric Germ Cell Divisions and Facilitate the Formation of a Polarized Microtubule Array for Oocyte Specification in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 189(1), 79–94. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8669>
- Díaz-Torres, A., Rosales-Nieves, A. E., Pearson, J. R., Santa-Cruz Mateos, C., Marín-Menguiano, M., Marshall, O. J., Brand, A. H., & González-Reyes, A. (2021). Stem cell niche organization in the *Drosophila* ovary requires the ECM component Perlecan. *Current Biology*, 31(8), 1744-1753.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.071>
- Drummond-Barbosa, D. (2019). Local and Physiological Control of Germline Stem Cell Lineages in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 213(1), 9–26. <https://doi.org/10.1534/genetics.119.300234>
- Duan, T., Cupp, R., & Geyer, P. K. (2021). *Drosophila* female germline stem cells undergo mitosis without nuclear breakdown. *Current Biology*, 31(7), 1450-1462.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.033>
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. *Genesis*, 34(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1002/gene.10150>
- DuFort, C. C., Paszek, M. J., & Weaver, V. M. (2011). Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(5), 308–319. <https://doi.org/10.1038/nrm3112>

- Ekholm, S. v., & Reed, S. I. (2000). Regulation of G1 cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(6), 676–684. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00151-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00151-4)
- Eliazer, S., & Buszczak, M. (2011). Finding a niche: studies from the *Drosophila* ovary. *Stem Cell Research & Therapy*, 2(6), 45. <https://doi.org/10.1186/scrt86>
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, 126(4), 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>
- Fox, P. M., Vought, V. E., Hanazawa, M., Lee, M.-H., Maine, E. M., & Schedl, T. (2011). Cyclin E and CDK-2 regulate proliferative cell fate and cell cycle progression in the *C. elegans* germline. *Development*, 138(11), 2223–2234. <https://doi.org/10.1242/dev.059535>
- Fu, J., Hagan, I. M., & Glover, D. M. (2015). The Centrosome and Its Duplication Cycle. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2), a015800. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015800>
- Gattazzo, F., Urciuolo, A., & Bonaldo, P. (2014). Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(8), 2506–2519. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.01.010>
- Godenschwege, T. A., Pohar, N., Buchner, S., & Buchner, E. (2000). Inflated wings, tissue autolysis and early death in tissue inhibitor of metalloproteinases mutants of *Drosophila*. *European Journal of Cell Biology*, 79(7), 495–501. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00072>
- Guo, Z., & Wang, Z. (2009). The glypican Dally is required in the niche for the maintenance of germline stem cells and short-range BMP signaling in the *Drosophila* ovary. *Development*, 136(21), 3627–3635. <https://doi.org/10.1242/dev.036939>
- Haas, C. S., Gleason, B., Lin, S., Tramonti, G., & Kanwar, Y. S. (2004). Matrix Metalloproteinases in Renal Development. *Connective Tissue Research*, 45(2), 73–85. <https://doi.org/10.1080/03008200490442644>
- Hahn, I., Voelzmann, A., Parkin, J., Fülle, J. B., Slater, P. G., Lowery, L. A., Sanchez-Soriano, N., & Prokop, A. (2021). Tau, XMAP215/Msps and Ebf1 co-operate interdependently to regulate microtubule polymerisation and bundle formation in axons. *PLOS Genetics*, 17(7), e1009647. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009647>
- Hinnant, T. D., Alvarez, A. A., & Ables, E. T. (2017). Temporal remodeling of the cell cycle accompanies differentiation in the *Drosophila* germline. *Developmental Biology*, 429(1), 118–131. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.07.001>
- Hinnant, T. D., Merkle, J. A., & Ables, E. T. (2020a). Coordinating Proliferation, Polarity, and Cell Fate in the *Drosophila* Female Germline. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00019>

- Hinnant, T. D., Merkle, J. A., & Ables, E. T. (2020b). Coordinating Proliferation, Polarity, and Cell Fate in the *Drosophila* Female Germline. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00019>
- Hsu, H.-J., LaFever, L., & Drummond-Barbosa, D. (2008). Diet controls normal and tumorous germline stem cells via insulin-dependent and -independent mechanisms in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 313(2), 700–712. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.11.006>
- Huynh, J. R., Shulman, J. M., Benton, R., & St Johnston, D. (2001). PAR-1 is required for the maintenance of oocyte fate in *Drosophila*. *Development*, 128(7), 1201–1209. <https://doi.org/10.1242/dev.128.7.1201>
- Hynes, R. O. (2009). The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science*, 326(5957), 1216–1219. <https://doi.org/10.1126/science.1176009>
- Jang, J. K., Sherizen, D. E., Bhagat, R., Manheim, E. A., & McKim, K. S. (2003). Relationship of DNA double-strand breaks to synapsis in *Drosophila*. *Journal of Cell Science*, 116(15), 3069–3077. <https://doi.org/10.1242/jcs.00614>
- Januschke, J., Llamazares, S., Reina, J., & Gonzalez, C. (2011). *Drosophila* neuroblasts retain the daughter centrosome. *Nature Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1245>
- Joyce, E. F., Pedersen, M., Tiong, S., White-Brown, S. K., Paul, A., Campbell, S. D., & McKim, K. S. (2011). *Drosophila* ATM and ATR have distinct activities in the regulation of meiotic DNA damage and repair. *Journal of Cell Biology*, 195(3), 359–367. <https://doi.org/10.1083/jcb.201104121>
- Kao, S., Tseng, C., Wan, C., Su, Y., Hsieh, C., Pi, H., & Hsu, H. (2015). Aging and insulin signaling differentially control normal and tumorous germline stem cells. *Aging Cell*, 14(1), 25–34. <https://doi.org/10.1111/accel.12288>
- Kracklauer, M. P., Banks, S. M. L., Xie, X., Wu, Y., & Fischer, J. A. (2007). *Drosophila* klaroid Encodes a SUN Domain Protein Required for Klarsicht Localization to the Nuclear Envelope and Nuclear Migration in the Eye. *Fly*, 1(2), 75–85. <https://doi.org/10.4161/fly.4254>
- LaFever, L., & Drummond-Barbosa, D. (2005). Direct Control of Germline Stem Cell Division and Cyst Growth by Neural Insulin in *Drosophila*. *Science*, 309(5737), 1071–1073. <https://doi.org/10.1126/science.1111410>
- LaFever, L., Feoktistov, A., Hsu, H.-J., & Drummond-Barbosa, D. (2010). Specific roles of Target of rapamycin in the control of stem cells and their progeny in the *Drosophila* ovary. *Development*, 137(13). <https://doi.org/10.1242/dev.050351>
- Lambert, M. W. (2019). The functional importance of lamins, actin, myosin, spectrin and the LINC complex in DNA repair. *Experimental Biology and Medicine*, 244(15), 1382–1406. <https://doi.org/10.1177/1535370219876651>

- Lawrence, K. S., Tapley, E. C., Cruz, V. E., Li, Q., Aung, K., Hart, K. C., Schwartz, T. U., Starr, D. A., & Engebrecht, J. (2016). LINC complexes promote homologous recombination in part through inhibition of nonhomologous end joining. *Journal of Cell Biology*, 215(6), 801–821. <https://doi.org/10.1083/jcb.201604112>
- Lee, L. A., & Orr-Weaver, T. L. (2003). Regulation of Cell Cycles in *Drosophila* Development: Intrinsic and Extrinsic Cues. *Annual Review of Genetics*, 37(1), 545–578. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143149>
- Lerner, D. W., McCoy, D., Isabella, A. J., Mahowald, A. P., Gerlach, G. F., Chaudhry, T. A., & Horne-Badovinac, S. (2013). A Rab10-Dependent Mechanism for Polarized Basement Membrane Secretion during Organ Morphogenesis. *Developmental Cell*, 24(2), 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.12.005>
- Li, L., & Xie, T. (2005). STEM CELL NICHE: Structure and Function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 605–631. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131525>
- Lighthouse, D. v., Buszczak, M., & Spradling, A. C. (2008). New components of the *Drosophila* fusome suggest it plays novel roles in signaling and transport. *Developmental Biology*, 317(1), 59–71. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.02.009>
- Lilly, M. A., de Cuevas, M., & Spradling, A. C. (2000). Cyclin A Associates with the Fusome during Germline Cyst Formation in the *Drosophila* Ovary. *Developmental Biology*, 218(1), 53–63. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9570>
- Lin, H., & Spradling, A. C. (1995). Fusome asymmetry and oocyte determination in *Drosophila*. *Developmental Genetics*, 16(1), 6–12. <https://doi.org/10.1002/dvg.1020160104>
- Lin, H., Yue, L., & Spradling, A. C. (1994). The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. *Development*, 120(4), 947–956. <https://doi.org/10.1242/dev.120.4.947>
- Llano, E., Pendás, A. M., Aza-Blanc, P., Kornberg, T. B., & López-Otín, C. (2000). Dm1-MMP, a Matrix Metalloproteinase from *Drosophila* with a Potential Role in Extracellular Matrix Remodeling during Neural Development. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46), 35978–35985. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006045200>
- Lombardi, M. L., Jaalouk, D. E., Shanahan, C. M., Burke, B., Roux, K. J., & Lammerding, J. (2011). The Interaction between Nesprins and Sun Proteins at the Nuclear Envelope Is Critical for Force Transmission between the Nucleus and Cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, 286(30), 26743–26753. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.233700>
- López-Onieva, L., Fernández-Miñán, A., & González-Reyes, A. (2008a). Jak/Stat signalling in niche support cells regulates dpp transcription to control germline stem cell maintenance in the *Drosophila* ovary. *Development*, 135(3), 533–540. <https://doi.org/10.1242/dev.016121>

- López-Onieva, L., Fernández-Miñán, A., & González-Reyes, A. (2008b). Jak/Stat signalling in niche support cells regulates dpp transcription to control germline stem cell maintenance in the *Drosophila* ovary. *Development*, 135(3), 533–540. <https://doi.org/10.1242/dev.016121>
- Losick, V. P., Morris, L. X., Fox, D. T., & Spradling, A. (2011). *Drosophila* Stem Cell Niches: A Decade of Discovery Suggests a Unified View of Stem Cell Regulation. *Developmental Cell*, 21(1), 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.018>
- Lottersberger, F., Karssemeijer, R. A., Dimitrova, N., & de Lange, T. (2015). 53BP1 and the LINC Complex Promote Microtubule-Dependent DSB Mobility and DNA Repair. *Cell*, 163(4), 880–893. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.057>
- Lu, W., Casanueva, M. O., Mahowald, A. P., Kato, M., Lauterbach, D., & Ferguson, E. L. (2012). Niche-Associated Activation of Rac Promotes the Asymmetric Division of *Drosophila* Female Germline Stem Cells. *PLoS Biology*, 10(7), e1001357. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001357>
- Ma, X., Han, Y., Song, X., Do, T., Yang, Z., Ni, J., & Xie, T. (2016). DNA damage-induced CHK2 activation compromises germline stem cell self-renewal and lineage differentiation. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.141069>
- Ma, X., Zhu, X., Han, Y., Story, B., Do, T., Song, X., Wang, S., Zhang, Y., Blanchette, M., Gogol, M., Hall, K., Peak, A., Anoja, P., & Xie, T. (2017). Aubergine Controls Germline Stem Cell Self-Renewal and Progeny Differentiation via Distinct Mechanisms. *Developmental Cell*, 41(2), 157–169.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.03.023>
- Mammoto, A., Mammoto, T., & Ingber, D. E. (2012). Mechanosensitive mechanisms in transcriptional regulation. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.093005>
- Mammoto, T., & Ingber, D. E. (2010). Mechanical control of tissue and organ development. *Development*, 137(9), 1407–1420. <https://doi.org/10.1242/dev.024166>
- Matias, N. R., Mathieu, J., & Huynh, J.-R. (2015). Abscission Is Regulated by the ESCRT-III Protein Shrub in *Drosophila* Germline Stem Cells. *PLOS Genetics*, 11(2), e1004653. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004653>
- Molines, A. T., Lemièrre, J., Gazzola, M., Steinmark, I. E., Edrington, C. H., Hsu, C.-T., Real-Calderon, P., Suhling, K., Goshima, G., Holt, L. J., They, M., Brouhard, G. J., & Chang, F. (2022). Physical properties of the cytoplasm modulate the rates of microtubule polymerization and depolymerization. *Developmental Cell*, 57(4), 466–479.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.02.001>
- Morris, L. X., & Spradling, A. C. (2011). Long-term live imaging provides new insight into stem cell regulation and germline-soma coordination in the *Drosophila* ovary. *Development*, 138(11), 2207–2215. <https://doi.org/10.1242/dev.065508>
- Morrison, S. J., Shah, N. M., & Anderson, D. J. (1997). Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology. *Cell*, 88(3), 287–298. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81867-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81867-X)

- Ninov, N., Manjón, C., & Martín-Blanco, E. (2009). Dynamic Control of Cell Cycle and Growth Coupling by Ecdysone, EGFR, and PI3K Signaling in *Drosophila* Histoblasts. *PLoS Biology*, 7(4), e1000079. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000079>
- Nissinen, L., & Kähäri, V.-M. (2014). Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(8), 2571–2580. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.03.007>
- Noatynska, A., Tavernier, N., Gotta, M., & Pintard, L. (2013). Coordinating cell polarity and cell cycle progression: what can we learn from flies and worms? *Open Biology*, 3(8), 130083. <https://doi.org/10.1098/rsob.130083>
- PAGEMCCAW, A. (2008). Remodeling the model organism: Matrix metalloproteinase functions in invertebrates. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(1), 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.06.004>
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J., & Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3), 221–233. <https://doi.org/10.1038/nrm2125>
- Panchal, T., Chen, X., Alchits, E., Oh, Y., Poon, J., Kouptsova, J., Laski, F. A., & Godt, D. (2017). Specification and spatial arrangement of cells in the germline stem cell niche of the *Drosophila* ovary depend on the Maf transcription factor Traffic jam. *PLOS Genetics*, 13(5), e1006790. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006790>
- Pastor-Pareja, J. C., & Xu, T. (2011). Shaping Cells and Organs in *Drosophila* by Opposing Roles of Fat Body-Secreted Collagen IV and Perlecan. *Developmental Cell*, 21(2), 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.026>
- Pearson, J. R., Zurita, F., Tomás-Gallardo, L., Díaz-Torres, A., Díaz de la Loza, M. del C., Franze, K., Martín-Bermudo, M. D., & González-Reyes, A. (2016). ECM-Regulator timp Is Required for Stem Cell Niche Organization and Cyst Production in the *Drosophila* Ovary. *PLOS Genetics*, 12(1), e1005763. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005763>
- Perkins, L. A., Holderbaum, L., Tao, R., Hu, Y., Sopko, R., McCall, K., Yang-Zhou, D., Flockhart, I., Binari, R., Shim, H.-S., Miller, A., Housden, A., Foos, M., Randkelv, S., Kelley, C., Namgyal, P., Villalta, C., Liu, L.-P., Jiang, X., ... Perrimon, N. (2015). The Transgenic RNAi Project at Harvard Medical School: Resources and Validation. *Genetics*, 201(3), 843–852. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.180208>
- Peterman, E., & Prekeris, R. (2019). The postmitotic midbody: Regulating polarity, stemness, and proliferation. *Journal of Cell Biology*, 218(12), 3903–3911. <https://doi.org/10.1083/jcb.201906148>
- Rebollo, E., Llamazares, S., Reina, J., & Gonzalez, C. (2004). Contribution of Noncentrosomal Microtubules to Spindle Assembly in *Drosophila* Spermatocytes. *PLoS Biology*, 2(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020008>

- Rebollo, E., Sampaio, P., Januschke, J., Llamazares, S., Varmark, H., & González, C. (2007). Functionally Unequal Centrosomes Drive Spindle Orientation in Asymmetrically Dividing *Drosophila* Neural Stem Cells. *Developmental Cell*, 12(3). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.01.021>
- Reilly, G. C., & Engler, A. J. (2010). Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *Journal of Biomechanics*, 43(1), 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.09.009>
- Richardson, H. E., O’Keefe, L. V., Reed, S. I., & Saint, R. (1993). A *Drosophila* G1-specific cyclin E homolog exhibits different modes of expression during embryogenesis. *Development*, 119(3), 673–690. <https://doi.org/10.1242/dev.119.3.673>
- Rojas-Ríos, P., Guerrero, I., & González-Reyes, A. (2012). Cytoneme-Mediated Delivery of Hedgehog Regulates the Expression of Bone Morphogenetic Proteins to Maintain Germline Stem Cells in *Drosophila*. *PLoS Biology*, 10(4), e1001298. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001298>
- Röper, K. (2007). Rtnl1 is enriched in a specialized germline ER that associates with ribonucleoprotein granule components. *Journal of Cell Science*, 120(6), 1081–1092. <https://doi.org/10.1242/jcs.03407>
- Rosenberg-Hasson, Y., Renert-Pasca, M., & Volk, T. (1996). A *Drosophila* Dystrophin-related protein, MSP-300, is required for embryonic muscle morphogenesis. *Mechanisms of Development*, 60(1), 83–94. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(96\)00602-8](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(96)00602-8)
- Royou, A., McCusker, D., Kellogg, D. R., & Sullivan, W. (2008). Grapes(Chk1) prevents nuclear CDK1 activation by delaying cyclin B nuclear accumulation. *Journal of Cell Biology*, 183(1), 63–75. <https://doi.org/10.1083/jcb.200801153>
- Rusan, N. M., & Peifer, M. (2007). A role for a novel centrosome cycle in asymmetric cell division. *Journal of Cell Biology*, 177(1), 13–20. <https://doi.org/10.1083/jcb.200612140>
- Salzmann, V., Chen, C., Chiang, C.-Y. A., Tiyaboonchai, A., Mayer, M., & Yamashita, Y. M. (2014). Centrosome-dependent asymmetric inheritance of the midbody ring in *Drosophila* germline stem cell division. *Molecular Biology of the Cell*, 25(2), 267–275. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-09-0541>
- Sanchez, A. D., & Feldman, J. L. (2017). Microtubule-organizing centers: from the centrosome to non-centrosomal sites. *Current Opinion in Cell Biology*, 44, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.09.003>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4(1–2), 7–25.

- Shimada, Y., Yonemura, S., Ohkura, H., Strutt, D., & Uemura, T. (2006). Polarized Transport of Frizzled along the Planar Microtubule Arrays in *Drosophila* Wing Epithelium. *Developmental Cell*, 10(2). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.11.016>
- Shulman, J. M., Benton, R., & St Johnston, D. (2000). The *Drosophila* Homolog of *C. elegans* PAR-1 Organizes the Oocyte Cytoskeleton and Directs oskar mRNA Localization to the Posterior Pole. *Cell*, 101(4), 377–388. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80848-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80848-X)
- Singh, A. M., & Dalton, S. (2009). The Cell Cycle and Myc Intersect with Mechanisms that Regulate Pluripotency and Reprogramming. *Cell Stem Cell*, 5(2), 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.07.003>
- Smith, M. F., Ricke, W. A., Bakke, L. J., Dow, M. P. D., & Smith, G. W. (2002). Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 191(1), 45–56. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00054-0)
- Snapp, E. L., Iida, T., Frescas, D., Lippincott-Schwartz, J., & Lilly, M. A. (2004). The Fusome Mediates Intercellular Endoplasmic Reticulum Connectivity in *Drosophila* Ovarian Cysts. *Molecular Biology of the Cell*, 15(10), 4512–4521. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-06-0475>
- Song, J. J., & Ott, H. C. (2011). Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends in Molecular Medicine*, 17(8), 424–432. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.03.005>
- Song, X., Zhu, C.-H., Doan, C., & Xie, T. (2002). Germline Stem Cells Anchored by Adherens Junctions in the *Drosophila* Ovary Niches. *Science*, 296(5574), 1855–1857. <https://doi.org/10.1126/science.1069871>
- Sosa, B. A., Rothbaler, A., Kutay, U., & Schwartz, T. U. (2012). LINC Complexes Form by Binding of Three KASH Peptides to Domain Interfaces of Trimeric SUN Proteins. *Cell*, 149(5), 1035–1047. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.046>
- Sperka, T., Wang, J., & Rudolph, K. L. (2012). DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(9), 579–590. <https://doi.org/10.1038/nrm3420>
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., & Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature*, 414(6859), 98–104. <https://doi.org/10.1038/35102160>
- Spradling, A., & Lin, H. (1993). Lin Spradling 1993 *Developmental Biology*. *Developmental Biology*, 159(1), 140–152.
- Stevens, N. R., Raposo, A. A. S. F., Basto, R., St Johnston, D., & Raff, J. W. (2007). From Stem Cell to Embryo without Centrioles. *Current Biology*, 17(17), 1498–1503. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.07.060>
- Stowers, R. S. (2021). Advances in Extracellular Matrix-Mimetic Hydrogels to Guide Stem Cell Fate. *Cells Tissues Organs*, 1–18. <https://doi.org/10.1159/000514851>

- Uhlmann, F., Bouchoux, C., & López-Avilés, S. (2011). A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: revisited. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1584), 3572–3583. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0082>
- Urciuolo, A., Quarta, M., Morbidoni, V., Gattazzo, F., Molon, S., Grumati, P., Montemurro, F., Tedesco, F. S., Blaauw, B., Cossu, G., Vozzi, G., Rando, T. A., & Bonaldo, P. (2013). Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration. *Nature Communications*, 4(1), 1964. <https://doi.org/10.1038/ncomms2964>
- Valencia-Expósito, A., Grosheva, I., Míguez, D. G., González-Reyes, A., & Martín-Bermudo, M. D. (2016). Myosin light-chain phosphatase regulates basal actomyosin oscillations during morphogenesis. *Nature Communications*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms10746>
- Van de Bor, V., Loreau, V., Malbouyres, M., Cerezo, D., Placenti, A., Ruggiero, F., & Noselli, S. (2021). A dynamic and mosaic basement membrane controls cell intercalation in *Drosophila* ovaries. *Development*, 148(4). <https://doi.org/10.1242/dev.195511>
- Van De Bor, V., Zimniak, G., Papone, L., Cerezo, D., Malbouyres, M., Juan, T., Ruggiero, F., & Noselli, S. (2015a). Companion Blood Cells Control Ovarian Stem Cell Niche Microenvironment and Homeostasis. *Cell Reports*, 13(3), 546–560. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.008>
- Van De Bor, V., Zimniak, G., Papone, L., Cerezo, D., Malbouyres, M., Juan, T., Ruggiero, F., & Noselli, S. (2015b). Companion Blood Cells Control Ovarian Stem Cell Niche Microenvironment and Homeostasis. *Cell Reports*, 13(3), 546–560. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.008>
- Venkei, Z. G., & Yamashita, Y. M. (2015). The centrosome orientation checkpoint is germline stem cell specific and operates prior to the spindle assembly checkpoint in *Drosophila* testis. *Development*, 142(1), 62–69. <https://doi.org/10.1242/dev.117044>
- Villa-Fombuena, G., Lobo-Pecellín, M., Marín-Menguiano, M., Rojas-Ríos, P., & González-Reyes, A. (2021). Live imaging of the *Drosophila* ovarian niche shows spectrosome and centrosome dynamics during asymmetric germline stem cell division. *Development*, 148(18). <https://doi.org/10.1242/dev.199716>
- Vu, T. H., & Werb, Z. (2000). Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & Development*, 14(17), 2123–2133. <https://doi.org/10.1101/gad.815400>
- Walworth, N. C. (2000). Cell-cycle checkpoint kinases: checking in on the cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(6), 697–704. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00154-X](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00154-X)
- Wang, L., Li, Z., & Cai, Y. (2008). The JAK/STAT pathway positively regulates DPP signaling in the *Drosophila* germline stem cell niche. *Journal of Cell Biology*, 180(4), 721–728. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711022>

- Wang, X., & Page-McCaw, A. (2018). Wnt6 maintains anterior escort cells as an integral component of the germline stem cell niche. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.158527>
- Wang, Z., & Lin, H. (2005). The Division of *Drosophila* Germline Stem Cells and Their Precursors Requires a Specific Cyclin. *Current Biology*, 15(4), 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.016>
- Wei, S., Xie, Z., Filenova, E., & Brew, K. (2003). *Drosophila* TIMP Is a Potent Inhibitor of MMPs and TACE: Similarities in Structure and Function to TIMP-3. *Biochemistry*, 42(42), 12200–12207. <https://doi.org/10.1021/bi035358x>
- Weissman, I. L. (2000). Stem Cells. *Cell*, 100(1), 157–168. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81692-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81692-X)
- Wilcockson, S. G., & Ashe, H. L. (2019). *Drosophila* Ovarian Germline Stem Cell Cytocensor Projections Dynamically Receive and Attenuate BMP Signaling. *Developmental Cell*, 50(3), 296–312.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.05.020>
- Wylie, A., Lu, W.-J., D’Brot, A., Buszczak, M., & Abrams, J. M. (2014). p53 activity is selectively licensed in the *Drosophila* stem cell compartment. *ELife*, 3. <https://doi.org/10.7554/eLife.01530>
- Xie, T., & Spradling, A. C. (1998). decapentaplegic Is Essential for the Maintenance and Division of Germline Stem Cells in the *Drosophila* Ovary. *Cell*, 94(2), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81424-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81424-5)
- Xie, T., & Spradling, A. C. (2000). A Niche Maintaining Germ Line Stem Cells in the *Drosophila* Ovary. *Science*, 290(5490), 328–330. <https://doi.org/10.1126/science.290.5490.328>
- Xing, Y., Su, T. T., & Ruohola-Baker, H. (2015). Tie-mediated signal from apoptotic cells protects stem cells in *Drosophila melanogaster*. *Nature Communications*, 6(1), 7058. <https://doi.org/10.1038/ncomms8058>
- Yamashita, Y. M. (2018). Subcellular Specialization and Organelle Behavior in Germ Cells. *Genetics*, 208(1), 19–51. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300184>
- Yamashita, Y. M., Jones, D. L., & Fuller, M. T. (2003). Orientation of Asymmetric Stem Cell Division by the APC Tumor Suppressor and Centrosome. *Science*, 301(5639), 1547–1550. <https://doi.org/10.1126/science.1087795>
- Yamashita, Y. M., Mahowald, A. P., Perlin, J. R., & Fuller, M. T. (2007). Asymmetric Inheritance of Mother Versus Daughter Centrosome in Stem Cell Division. *Science*, 315(5811), 518–521. <https://doi.org/10.1126/science.1134910>
- Yu, J.-Y., Reynolds, S. H., Hatfield, S. D., Shcherbata, H. R., Fischer, K. A., Ward, E. J., Long, D., Ding, Y., & Ruohola-Baker, H. (2009). Dicer-1-dependent Dacapo suppression acts downstream of Insulin receptor in regulating cell division of *Drosophila* germline stem cells. *Development*, 136(9), 1497–1507. <https://doi.org/10.1242/dev.025999>

- Yuan, H., Chiang, C.-Y. A., Cheng, J., Salzmann, V., & Yamashita, Y. M. (2012). Regulation of cyclin A localization downstream of Par-1 function is critical for the centrosome orientation checkpoint in *Drosophila* male germline stem cells. *Developmental Biology*, 361(1), 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.10.010>
- Yue, L., & Spradling, A. C. (1992). *hu-li tai shao*, a gene required for ring canal formation during *Drosophila* oogenesis, encodes a homolog of adducin. *Genes & Development*, 6(12b), 2443–2454. <https://doi.org/10.1101/gad.6.12b.2443>
- Zielke, N., Korzelius, J., van Straaten, M., Bender, K., Schuhknecht, G. F. P., Dutta, D., Xiang, J., & Edgar, B. A. (2014). Fly-FUCCI: A Versatile Tool for Studying Cell Proliferation in Complex Tissues. *Cell Reports*, 7(2), 588–598. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.020>
- Zou, C., Li, J., Bai, Y., Gunning, W. T., Wazer, D. E., Band, V., & Gao, Q. (2005). Centrobilin. *Journal of Cell Biology*, 171(3), 437–445. <https://doi.org/10.1083/jcb.200506185>

AGRADECIMIENTOS

En 2016 comencé a trabajar en el proyecto que ha dado lugar a esta tesis doctoral, pero por supuesto el mérito no es sólo mío ni todo empezó de cero en ese momento. Para llegar hasta aquí, he tenido la suerte de contar con el apoyo de muchas personas y sobre todo de poder aprender de ellas mucho más de lo que recoge esta tesis. Así que, recordando a esas personas que he ido encontrando en las distintas etapas del camino (que han sido muchos años dando vueltas en el CABD), aquí va mi profundo agradecimiento a todas ellas.

A mi director de tesis, Acaimo. Gracias por el esfuerzo hecho para llevar esta tesis a buen puerto, sobre todo en el sprint final. Y gracias por hacer fácil la comunicación, teniendo siempre tiempo y buena disposición para las preguntas, reuniones y gestiones que hicieran falta, tanto del trabajo de tesis como del día a día en el laboratorio.

A Jose Luis Gómez-Skarmeta, Lola Martín-Bermudo y Fernando Casares. Antes del doctorado, cada uno de ellos me dio la oportunidad de participar en sus laboratorios, aprender de su trabajo y conocer diferentes aproximaciones en ciencia. A todos les agradezco su apoyo y su afán por mantener el buen nivel científico del CABD. Tengo la suerte de encontrarme entre los alumnos internos, estudiantes de trabajo fin de máster y ayudantes de investigación que han podido disfrutar de las bondades de sus grupos. Por todo lo aprendido con ellos, gracias.

A todos mis compañeros de los inicios de esta etapa doctoral en el lab 114.

María Lobo, mi primera compi de mesa, de las personas más echadas para adelante que conozco y que tiraba como nadie los tubos de moscas al suelo los viernes por la tarde. Gracias por tantísimas risas, conversaciones y momentazos, y por ser ejemplo de lucha, esfuerzo y convicción en uno mismo. Y gracias por tus pasos previos, que contribuyeron a que este proyecto finalmente se convirtiera en tesis.

Alicia, que me cediste tu sitio nada más llegar y junto con María hicisteis que los comienzos en 114 fueran extraordinarios. Gracias por todo lo que aprendí contigo en el lab. Nunca se nos acabarán las series y cotilleos famosiles que comentar.

Miriam, doctora, lab manager, research assistant, figura de cohesión del lab y lo que le echas, ella es multitarea, y todo lo hace con orden, precisión y una simpatía desbordante. Gracias por aguantarme con todas las cosas moleculares, por tener paciencia infinita con mis bloqueos pipeta en mano, o cuando le eché el ladder a las muestras en vez del loading buffer (lo he tenido que pensar, sí, y todavía tengo miedo de haberlo escrito mal). Gracias por toda la ayuda durante la tesis, a todos los niveles, y por aceptar mis taritas con tanto cariño.

Judith, brillante y muy cuidadosa en todo lo que haces, gracias por ser tan magnífica compañera del lab y mi segunda compi de mesa que ha convivido con mis manías y tonteridas. Gracias por tantas conversaciones interesantísimas de cualquier cosa, y que vengan muchas más.

Dilamm, cabeza llenísima de conocimiento y de aparejos de pesca. Gracias por ayudarme junto con Judit a bichear en el Genome Browser y a tantas otras cosas del lab, pero sobre todo gracias por el compañerismo y por contribuir a la piña que hemos formado todos.

Adrián, el técnico más dicharachero, tú también has aguantado mis muchas manías, siempre ayudando en lo que hiciera falta, incluso en hacer complot para chinchar a Dilamm (aunque reconozcámoslo, también te hemos chinchado a ti; el caso es chinchar, no discutiremos quién era el componente común aquí). Quedan seguro muchas pelis y series que debatir.

Gracias por supuesto también a los compañeros que encontré en el lab 111.

Andrea, Andrea, Andrea. Qué te digo Andrea. Pues te digo que eres una máquina y que verte trabajar a ese nivel, y con esa calma y buen hacer que tienes, es impresionante. Que siempre estás para todo y que tu apoyo ha sido fundamental. Gracias por las risas, los debates de vicisitudes y por ser una grandísima amiga.

Carmina, tú también has sido de los grandes apoyos iniciales, siempre aportando alegría en todo lo que haces y siendo un ejemplo de que se pueden lograr muchas metas. Gracias por tu colaboración durante esta tesis, aunque fuera todo un poco loco, pero mucho más te agradezco todos los buenos recuerdos que aportaste, desde los tiempos inmemoriales en que pedíamos la bandeja de papilla compartida.

Ester, lo que hemos desfogado en las conversaciones infinitas, y mucho bien que hacían; gracias por todos esos ratos. Lourdes, a caballo entre 111 y 114, siempre dispuesta a todo con una sonrisa, gracias por contribuir al buen ambiente de los laboratorios. Jennifer, gracias por ser ejemplo de esfuerzo y superación, que son importantes en cualquier momento del camino.

Gracias a los lolaimos más clásicos, con los que coincidí en mayor o menor media, pero que sin duda dejaron su huella. Besaid, que me viste con cara de pérdida el primer día del TFM y me presentaste a todos los de los dos laboratorios, y desde entonces no he dejado de aprender de ti, porque tú siempre lo das todo y estás para todo. Bea Ibáñez, me enseñaste las bases del trabajo con *Drosophila*, que tu esfuerzo te costó que yo me enterara de cómo se cambian los stocks y los cruces; no concebía yo eso de pasar de un tubo a otro, y que si 10 días y 20 días...y

fíjate dónde hemos acabado. Bea Estrada y Juanjo, que me alucinasteis con vuestra ciencia, más el buen rollo que aportabais siempre. Aunque me quedan más lejanas, no me olvido de Alfonsa, Cecilia y Mari Carmen. Mi tesis se ha podido desarrollar gracias a los precedentes de la tesis de Alfonsa; con Ceci compartí muy buenos ratos de risas en el pequeño regreso que hizo durante mi doctorado; y Mari Carmen of course, que ha contribuido con su trabajo de ilustración en el paper y con la que también he echado buenas risas. No puedo olvidarme tampoco de otros compañeros que pasaron de forma más breve por los lab, pero igualmente dejaron su granito: Patri por ser la asturiana más buena gente y Fernando el Físico por enseñarme los tejemanajes de los trackings.

A los compañeros más recientes, Salva, Javi y Ana, aunque sólo hemos podido compartir poquito tiempo, gracias por vuestra simpatía y por hacer el trabajo en pandemia más llevadero, que eso no es poco. Y Juan, que, aunque suene a trabalenguas, apenas coincidí contigo antes ni tú has coincidido apenas conmigo ahora, pero te deseo lo mejor en tu nueva etapa en 114.

Como dije al principio, he dado muchas vueltas por el CABD y también tengo que agradecer a varias personas lo aprendido en ese recorrido.

Ana Miñán y Rocío Morales, quienes me enseñaron tanto y me ayudaron a dar los primeros pasos en un laboratorio real, que no fuera el de prácticas de la universidad. Qué suerte que ese primer contacto fuera de la mano de dos profesionales tan buenas y aun mejores personas, que me explicaban todo con paciencia y buen ánimo, y me hacían sentir muy integrada. Gracias también a Solángel, siempre dispuesta a ayudar en la sala de peces.

Diana y Marta, que me acogieron tan bien en Casares lab y de las que pude aprender muchísimo, además de echar buenos ratos de risas. Gracias por ayudarme en lo que hiciera falta, por generar tan buen ambiente, por las meriendas, por las cenas y por ser dos personas brillantes a las que admiro mucho, a muchos niveles. Gracias también a los antiguos vecinos Carlos y Mar, por la compañía dentro y fuera de la sala de moscas. Y gracias también a Sol, por ayudar siempre en lo que ha podido.

Paola, Félix y Rafa Hoyos de Genética. Gracias por las risas y penas compartidas, por dejar un gran recuerdo de las jornadas doctorales y por ayudarme con mis extrañas preguntas de ciclo celular y derivados. Los caminos van divergiendo, pero nos queda el grupo de whatsapp para mandar memes.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores del CABD, James y Juan Ramón, por su interés, sus consejos y su participación en el seguimiento de esta tesis.

Al personal del CABD, sin el que no sería posible realizar los experimentos que constituyen este trabajo. Kathy, por enseñarme a usar tantos microscopios y por estar siempre dispuesta a ayudar. A Mari Carmen, Fati y Tamara, de cocina, por sacar adelante los pedidos de papilla y preparar el material que necesitamos.

En el mundo que existe fuera del CABD, a mis amigos de toda la vida Asun, Dani, Luis, Paz y Reyes, por los buenos ratos cada vez que nos vemos, sin importar el tiempo que pase, y por compartir y apoyarnos en nuestras vivencias.

Por último, porque ellos son los que al final siempre están ahí, gracias a mi familia. Gracias a mis padres, Maruja y Diego, que han hecho posible todo este camino, siempre con cariño, apoyo y libertad para dar cualquier paso. Gracias a mis hermanos, María, Belén y Diego, y Norberto como brother-in-law, también por todo su apoyo. Gracias a mis sobrinos, Diego, Inés, Mara, María y Ana, porque son una gente muy simpática con la que lo paso muy bien y que seguro me seguirán enseñando muchas más cosas de lo que yo pueda enseñarles a ellos.

Porque en definitiva de eso se trata todo esto, de estar continuamente aprendiendo de quienes te rodean. A todos, gracias.